



Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

ACCIÓN DE LA INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA WISTAR:

Efecto del envejecimiento, la restricción
calórica y la leptina en la rata Wistar.

Memoria que presenta el Licenciado

ALAIN JUAN DE SOLÍS

Para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Director de la tesis:
Dr. JOSE MARÍA CARRASCOSA BAEZA

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Dra. Jorgina Satrústegui Gil-Delgado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), en Madrid, entre los años 2006 y 2011.

La financiación fue aportada desde un proyecto Intramural CSIC (Marzo 2006-Diciembre 2006), el proyecto de la Unión Europea LSHM-CF2006-518153 (Enero 2007-Diciembre 2007) y el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación BFU2008-04901-CO3-01/BF1. El Centro de Biología Molecular Severo Ochoa recibe aporte de la Fundación Ramón Areces.

Agradecimientos.

Como era de esperar, esta parte la escribo apurando el tiempo antes de entregar este trabajo, y aunque parezca sencillo, escribir esto cuesta casi más que el resto de esta Tesis. Es difícil resumir en un par de hojas a todas aquellas personas que han colaborado estos años de mil formas diferentes en terminar esta tesis y las que tengo tanto que agradecer.

Aunque en la portada ponga mi nombre, la realidad es que esta tesis surge de un conjunto de miles y miles de pequeños detalles, ayudas, consejos y meteduras de pata; de acciones desinteresadas y acciones interesadas, palabras de ánimo, advertencias y quejas, incluyendo súplicas y cabreos; de millones de risas y anécdotas que han ocurrido diariamente sin que nos demos cuenta durante este tiempo, dentro del labo, en los pasillos, en la cafetería, en la pérgola o en el cercanías; así como charlando de cosas sin importancia, celebrando cualquier oportunidad en las cañas de los viernes, que fueron seguidas de más cervezas y de pacharanes y copas; en conciertos, manifestaciones y juergas varias por los bares y las calles de Madrid; para volver al día siguiente y seguir riéndonos de todo (y de nosotros mismos, por supuesto), mientras tenemos la suerte de poder seguir trabajando en lo que nos apasiona, aunque a veces nos lleve de cabeza...

Es por esto que atribuir a cada uno de estos infinitos gestos a cada persona, me es imposible. Por eso me permitiréis que no mencione personalmente a cada uno de las personas a las que tanto debo, y os agrupe un poco. Se que muchos protestarán al no verse mencionados explícitamente, pero que tengan la seguridad de que un fragmento de esta tesis es suyo, sin lugar a dudas. Si alguien siente que le he olvidado, puede reclamarme y ya discutiremos su grado de aportación mientras tomamos algo en el bar. Sin embargo, sí hay personas a las que debo citar por sus nombres.

En primer lugar debo agradecer al profesor Jose María Carrascosa la oportunidad de poder realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Durante estos años me ha enseñado como adentrarme en el mundo del metabolismo, así como de la "Ciencia", en sus aplicaciones teóricas y prácticas. En todo momento me ha dado una enorme libertad para investigar y ampliar mis conocimientos, que ha permitido que ambos podamos completar este trabajo. Gracias de nuevo.

En segundo lugar, agradecer a la Profesora Jorgina Satrustegui la posibilidad de desarrollar esta tesis en su laboratorio. Esto ha permitido poder formar parte de un grupo increíble, donde he pasado grandes momentos y de los que he aprendido muchas cosas y entre ellas, un poco de mitocondria.

En tercer lugar, a todo el personal del CBM que nos ha facilitado la vida y el trabajo durante estos años y sin los que esta tesis hubiera costado el doble. Dentro de este amplio grupo, sin duda alguna a quien más tengo que agradecer es al personal del Animalario, donde todos y cada uno me han ayudado de una forma encomiable. Muchas gracias por todo.

Tampoco puedo olvidar al apoyo científico y personal de los grupos de investigación de los profesores Elena Bogonez, Manuel Ros y Antonio Andrés. Sin su ayuda, consejos, amistad y cientos de horas en el Animalario tampoco habríamos podido completar este trabajo.

Como no, agradecer infinitamente a toda aquel que ha pasado por el laboratorio CX-450 y sus filiales, los labos 321 y 305, a los que están todavía aquí y a los que marcharon a nuevos labos. Han sido muchas (demasiadas) horas conviviendo, trabajando y luchando por sacar adelante los proyectos de cada uno y de todos.

No se me ocurre mejor labo que este para haber realizado esta tesis, rodeado de mitocondriólogos. Aún tenéis que aguantarme un poco más, para seguir diciendo tonterías, bajando al animalario, escuchando radio3 y siendo faltosos...

A este grupo van aquellos que, aún perteneciendo a otros grupos y afiliaciones, han tomado parte importante alegrándome el día a día y ayudando a llevar mejor eso de venir a currar a diario. Gracias.

También debo agradecer muchas cosas a la pequeña comunidad que formamos parte del laboratorio del Dr Caramelo y que sobrevivimos a la FJD. Fueron tres años de aprendizaje pero sobretodo de amistad, risas y ricas comidas, que me permitió llegar hasta el CBM.

Tampoco puedo olvidar al diverso grupo donde se gestó este raro interés por la Investigación, formado espontáneamente durante la Licenciatura de Bioquímica, y reforzado a base de n-mil cañas a lo largo de este tiempo. Sigue siendo genial poder compartir nuestras penas y momentos de gloria con vosotros, además de esa extraña capacidad de buscar y encontrar bares cuanto menos curiosos...

En paralelo existe otro grupo de personas a las que debo mucho al proporcionarme otra visión de la Investigación y la sensación de luchar y poder cambiar un poco las cosas. Ellos son la gente con la que he colaborado en Precarios y en Precarios-Madrid, que a pesar de las horas de sueño y de curro empleadas, hacen que merezca la pena. Me alegro de haber coincidido y currado vestido de naranja con vosotros.

Otro gran trozo de esta tarta pertenece a todos aquellos que no trabajan en Investigación, sino en cosas tan necesarias como bancos, ministerios, cooperación internacional y mil curros mas, y que siempre han estado apoyándome para completar esto. Mil gracias por comprender lo que implica este trabajo y por darme ánimos y nuevas perspectivas, que no siempre es bueno estar rodeado de científicos...

Una parte muy especial de este trabajo pertenece a Carmen, por millones de cosas que aquí no caben, pero sobretodo por darme confianza en mi mismo cuando me faltó al final de mi periplo en la FJD. Gracias de corazón, por eso y por mucho más.

Otros que tienen gran culpa es mi querida Familia Disfuncional, con todos sus miembros humanos, no-humanos y afiliados, que han sido mi segunda familia durante 4 años. No dudéis de que seguiré propagando la disfuncionalidad allá por donde vaya.

Eli, soy incapaz de explicar lo mucho que esta tesis y sobretodo yo, te debemos. No sólo por la ayuda práctica, aportada de forma continua estos años y especialmente en el último (y duro) tramo, sino por haber tenido la inmensa suerte de encontrarme contigo en el momento y en el lugar justos; y de que me enseñes a luchar por todas las cosas que quiero y a ser un poco más feliz día a día haciendo el bobo. Recuerda, todavía nos queda mucho por hacer...

Por último, no pueden faltar mis padres y mi familia, que con su apoyo a lo largo de toda mi vida me han dado las fuerzas para llegar hasta aquí, aunque a veces no comprendan en que ando metido.... Ellos pusieron la primera piedra hace mucho tiempo, al permitirme y alentarme a hacer lo que realmente yo quería y parece que de momento ha dado resultado. Gracias por creer en mí.

"Volveré a tener fe, me fiaré de los peces de colores... la luna siempre nueva y creciente ..Hemos llegado hasta aquí..." NUEVA VULCANO

Summary

Nowadays the number of patients suffering of obesity and diabetes type II is increasing far beyond the predictions of the WHO. It has been long demonstrated that ageing associates with insulin resistance in humans and rodents, and the WHO considers ageing as one of the risk factors associated with the type II diabetes and obesity epidemics. The Wistar rat has emerged as an appropriate experimental model to study the development of insulin resistance in the absence of marked changes in glucose homeostasis so that alterations in insulin action of primary character can be established.

During the last two decades, our research group has studied the development of insulin resistance in the Wistar rat and established that insulin resistance develops first on the adipose tissue and the hypothalamus in association with a large increase in visceral adiposity. At advanced age rats develop overall insulin resistance together with central leptin resistance and hyperleptinemia. Following previous studies in isolated adipocytes that showed that both, central and peripheral leptin action inhibit insulin signaling and insulin action on fat tissue, in this work we have further explored whether leptin could also contribute to the development and maintenance of insulin resistance in skeletal muscle during aging. In order to do that we analyzed *in vivo* early insulin signaling, as well as *ex vivo* insulin stimulation of glucose transport, in oxidative and glycolytic skeletal muscles from 3-, 8-, and 24-month old rats. In addition, similar studies were performed in muscles from 8- and 24-month old animals after three months of moderate caloric restriction, in order to separate the effects of ageing from those of increased adiposity.

Our data in this work indicate that ageing associates with a decreased insulin signaling in oxidative and glycolytic muscles. Oxidative muscles show lower insulin signaling at early aging (8-month old animals) whereas glycolytic fibres develop insulin resistance at a later stage. As previously shown, caloric restriction improves insulin sensitivity in skeletal muscle and is more efficacious in younger than in older animals. Our work also shows that leptin stimulates directly skeletal muscle and that this action decreases along ageing. Interestingly, both *in vivo* leptin infusion and *ex vivo* leptin pretreatment of muscles strips results in a decreased capacity of insulin to stimulate insulin signaling and glucose uptake in muscle. Part of the leptin effect on insulin stimulation of glucose transport seems to be due to its ability to inhibit p38 phosphorylation. Nevertheless, further studies are needed to elucidate how leptin blocks insulin receptor phosphorylation in response to insulin. We propose that leptin elicits two different effects on insulin action, one due to its signaling through the hypothalamus and the central nervous system, which results in the sensitization of muscle to insulin action, and the other one mediated by its direct interaction with muscle leptin receptors that blocks insulin signaling and insulin action. We postulate that this direct action of high doses of leptin plays likely an important role in the development and/or maintenance of insulin resistance during aging.

Índice

I. ÍNDICE	11
II. ABREVIATURAS	19
III. INTRODUCCIÓN	23
1. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA INSULINA.	25
a. Efectos periféricos de la insulina.	26
b. Efectos centrales de la insulina.	27
c. Mecanismos moleculares de la acción de insulina.	27
i. Vía metabólica de la señalización de la insulina.	27
ii. Vía mitogénica de la señalización de insulina.	30
iii. Otras vías implicadas en la señalización de la insulina.	30
2. RESISTENCIA A INSULINA.	31
a. Desarrollo de la resistencia a insulina periférica.	31
b. Bases moleculares de la resistencia a insulina	32
3. METABOLISMO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.	34
a. Acción de la insulina en el músculo esquelético.	35
b. Desarrollo de la resistencia a insulina en el músculo.	35
4. LA LEPTINA.	36
a. Funciones fisiológicas de la leptina.	36
b. Mecanismo molecular de la acción de leptina.	38
c. Efecto directo de la leptina en el músculo esquelético.	39
5. RESISTENCIA A LEPTINA	41
6. INTERACCION ENTRE LA ACCIÓN DE LEPTINA Y DE INSULINA.	43
7. RESISTENCIA A INSULINA Y ENVEJECIMIENTO: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA.	44
IV. OBJETIVOS	49
V. MATERIALES Y MÉTODOS.	53
1. Modelo experimental.	55
a. Modelo de envejecimiento.	55
b. Modelo de restricción calórica (RC).	55
2. Caracterización del modelo experimental.	55
a. Extracción de sangre y determinación de niveles de parametros bioquímicos.	55
b. Test de tolerancia a insulina.	55
3. Protocolos experimentales.	56
a. Tratamientos <i>in vivo</i> mediante inyección intravenosa (iv).	56
b. Tratamientos <i>ex vivo</i> : Aislamiento de <i>strips</i> de músculo y medida de la incorporación de 2-DOG.	57
c. Tratamiento central con leptina: Implantación intracerebroventricular de mini bombas osmóticas.	58
4. Determinación histoquímica de lípidos en el músculo	58
5. Análisis de la expresión de mRNA en músculo.	59
a. Extracción de RNA y síntesis del cDNA	59
b. Análisis de los cDNA mediante <i>realtime</i> -PCR.	59
6. Análisis de la señalización intracelular en músculo esquelético.	59
a. Obtención de extractos totales de músculo.	59

b. Inmunodetección de proteínas.	60
c. Análisis de la fosforilación de IR β e IRS-1.	60
7. Análisis estadístico de los resultados.	61
8. Anexo materiales y métodos.	61
a. Tabla de anticuerpos	61
b. Tabla de las secuencias de <i>primers</i> .	62
c. Listado de tampones.	63
VI. RESULTADOS	63
1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE RATA WISTAR.	67
2. CARACTERIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA WISTAR: EFECTO DE LA EDAD Y LA RC.	70
A. Análisis de la capacidad de almacenamiento de lípidos en músculo esquelético de rata Wistar.	70
B. Análisis de la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico muscular.	70
C. Análisis de la expresión de proteínas de las vías de señalización de insulina y leptina en músculo esquelético.	74
3. ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.	75
A. Estudio de la acción aguda de insulina <i>in vivo</i> en el músculo esquelético.	75
B. Acción de la insulina <i>in vivo</i> : Efecto de la edad y la RC en la señalización intracelular inducida por insulina en músculo.	76
C. Estudio del transporte de glucosa inducido por insulina <i>ex vivo</i> .	78
4. EFECTO DIRECTO DE LEPTINA SOBRE EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.	80
A. Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la señalización de leptina en músculo esquelético.	80
B. Efecto directo de la leptina <i>in vivo</i> sobre el músculo esquelético.	82
C. Efecto de la edad y la RC en la acción directa de la leptina <i>in vivo</i> .	83
D. Efecto directo de leptina <i>in vivo</i> sobre la vía de señalización de insulina en el músculo esquelético.	84
E. Inducción del transporte de glucosa por acción directa de leptina.	85
5. EFECTO DE LA ACCIÓN DIRECTA DE LEPTINA SOBRE LA ACCIÓN DE INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.	87
A. Efecto del pretratamiento con leptina sobre la acción de insulina <i>in vivo</i> en músculos de ratas de 3 meses de edad.	87
B. Efecto de la edad y la RC en las alteraciones producidas por el pretratamiento con leptina en la acción de insulina <i>in vivo</i> en el músculo.	88
C. Efecto del pretratamiento con leptina <i>ex vivo</i> en la incorporación de glucosa inducida por insulina en músculo aislado.	91

6. POSIBLE PAPEL DE p38 EN LA INTERACCIÓN DE LAS SEÑALES DE LEPTINA E INSULINA EN MÚSCULO.	93
A. Efecto de insulina y leptina en la fosforilación de p38 en el músculo de ratas de 3 meses de edad.	93
B. Efecto de la edad y la RC sobre la acción insulina y leptina sobre la fosforilación de p38 en músculo.	94
C. Papel de p38 en el transporte de glucosa inducido por insulina.	96
7. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE ALTAS DOSIS DE LEPTINA EN RATAS DE 3 MESES DE EDAD.	98
A. Efectos fisiológicos del tratamiento central con leptina.	98
B. Efectos del tratamiento central con leptina en la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético.	99
C. Comparación de los efectos centrales y periféricos de leptina sobre la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético.	100
VII. DISCUSIÓN	103
A. Acción de insulina sobre el músculo esquelético.	107
B. Acción directa de la leptina sobre el músculo esquelético.	110
C. Efecto de altas dosis de leptina sobre la acción de insulina en el músculo esquelético.	113
D. Papel de p38 en el efecto de leptina sobre la estimulación por insulina del transporte de glucosa.	115
E. Comparación de los efectos centrales y periféricos de altas dosis de leptina sobre la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético de ratas de 3 meses de edad.	117
VIII. CONCLUSIONES	121
IX. BIBLIOGRAFÍA	127
X. ANEXO	147
1. Artículos publicados	
2. Comunicaciones a congresos internacionales	

ÍNDICE DE FIGURAS

III. INTRODUCCIÓN

Esquema 1. Efectos periféricos y centrales de la insulina en el metabolismo.	26
Esquema 2. Acciones intracelulares de la insulina.	29
Esquema 3. Consecuencias del desarrollo de resistencia a insulina.	32
Esquema 4. Efectos directos y centrales de la leptina sobre el metabolismo	37
Esquema 5. Señalización de leptina y metabolismo lipídico en el músculo esquelético	40
Esquema 6. Relación entre la obesidad y la resistencia central a leptina.	41
Esquema 7. Desarrollo de la resistencia a insulina con la edad.	45

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema MM1. Protocolo experimental para el análisis de la acción in vivo de insulina y leptina sobre el músculo esquelético	56
Esquema MM2. Protocolo experimental para la determinación del transporte de glucosa en músculo esquelético aislado de rata Wistar	57

VI. RESULTADOS

Figura 1. Caracterización del modelo experimental de rata Wistar.	67
Figura 2. Medidas de los principales parámetros metabólicos presentes en suero.	68
Figura 3. Cambios en la sensibilidad a insulina con la edad y la RC.	69
Figura 4. Efecto de la edad y la RC en el almacenamiento de lípido intramiocelulares.	70
Figura 5. Análisis de la expresión relativa de los mRNA de las principales enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en el músculo esquelético: efecto de la edad y la RC.	73
Figura 6. Análisis de la expresión de proteínas de las vías de señalización de insulina y leptina en el músculo esquelético.	74
Figura 7. Variación con el tiempo de la acción de insulina in vivo sobre el músculo esquelético.	75
Figura 8. Acción de la insulina in vivo: efecto de la edad y la RC en la fosforilación en tirosina de IR β .	76
Figura 9. Acción de la insulina in vivo: efecto de la edad y la RC en la fosforilación en tirosina de IRS-1.	77
Figura 10. Acción de la insulina in vivo: efecto de la edad y la RC en la fosforilación en serina de Akt.	78
Figura 11. Transporte de glucosa ex vivo: efecto de la edad y la RC en el transporte inducido por insulina.	79
Figura 12. Expresión relativa de los mRNA de las proteínas que participan en la vía de señalización de leptina en el músculo esquelético: efecto de la edad y la RC.	81
Figura 13. Efecto directo de leptina in vivo sobre el músculo esquelético.	82
Figura 14. Efecto directo de leptina in vivo sobre la estimulación de AMPKa en músculo: efecto de la edad y la RC.	84
Figura 15. Comparación del efecto in vivo de leptina e insulina, sobre la fosforilación de proteínas implicadas en la vía de señalización de insulina en el músculo esquelético de ratas de 3 meses de edad.	84
Figura 16. Estimulación por leptina de la fosforilación de IRS-1 en músculo: efecto de la edad y la RC.	85
Figura 17. Estimulación por leptina del transporte de glucosa en strips de músculo: efecto de la edad y la RC.	86
Figura 18. Efecto del tratamiento con leptina sobre la vía de señalización de insulina in vivo en el músculo esquelético.	88
Figura 19. Efecto del tratamiento previo con leptina sobre la fosforilación de IR β inducida por insulina in vivo en músculo: efecto del envejecimiento y la RC.	89
Figura 20. Efecto del tratamiento previo con leptina sobre la fosforilación de IRS-1 inducida por insulina in vivo en músculo: efecto del envejecimiento y la RC.	90

Figura 21. Efecto del tratamiento previo con leptina sobre la fosforilación de Akt inducida por insulina in vivo en músculo: efecto del envejecimiento y la RC.	90
Figura 22. Efecto del preincubación con altas dosis de leptina en la incorporación de glucosa inducida por insulina en strips de músculos: efecto del envejecimiento y la RC.	92
Figura 23. Efecto del tratamiento in vivo con insulina, leptina o leptina + insulina sobre la fosforilación de p38 en músculo esquelético.	93
Figura 24. Efecto del envejecimiento y la RC sobre la capacidad de estimulación de la fosforilación de p38 mediante tratamientos in vivo con insulina, leptina o leptina + insulina en soleus.	94
Figura 25. Efecto del envejecimiento y la RC sobre la capacidad de estimulación de la fosforilación de p38 mediante tratamientos in vivo con insulina, leptina o leptina + insulina en EDL.	95
Figura 26. Efecto de la inhibición de p38 en el transporte de glucosa inducido por insulina en músculo esquelético de ratas de 3 meses.	97
Figura 27. Acción central de leptina: efecto sobre la ingesta.	98
Figura 28. Acción central de leptina: efecto sobre el peso corporal.	99
Figura 29. Efecto del tratamiento central con leptina sobre la sensibilidad a insulina del músculo esquelético.	100
Figura 30. Efecto directo de una dosis alta de leptina en la estimulación del transporte de glucosa ex vivo tras el tratamiento central con leptina.	101
 VII. DISCUSIÓN	
Modelo 1. Mecanismo celular propuesto para el efecto del pretratamiento con leptina sobre la acción de insulina en el músculo esquelético.	116
Modelo 2. Esquema de la interacción de leptina e insulina en el músculo esquelético durante el envejecimiento.	118

Abreviaturas

2-DOG: 2-deoxyglucosa
 ACC: Acil coenzima A carboxilasa
 AG: Ácido graso
 AgRP: Peptido relacionado Agouti
 AL: *Ad libitum*
 Akt: Proteína kinasa B
 AMP: Adenosil monofosfato
 AMPK: kinasa de proteínas activada por 5'-AMP
 AS160: Substrato de Akt de 160 Kda
 ATF: Factor activador de la transcripción
 ATP: Adenosil trifosfato
 BSA: Albumina de suero bovino
 CART: Peptido relacionado con cocaína y anfetamina
 cDNA: ADN complementario
 CD36: Transportador de ácidos grasos
 CPT-1B: Carnitin-palmitoil transferasa 1 B.
 CoA: Coenzima A
 DGAT-1: Diacilglicerol acil transferasa
 DMH: Núcleo dorsomedial del hipotálamo
 Erk: Kinasa regulada extracelularmente
 FAS: Ácido graso sintasa
 FATP: Proteínas transportadora de ácidos grasos
 FOXO: Proteína de la caja Forkhead
 G6Pase: Glucosa-6-fosfatasa
 GLUT-4: Transportador de glucosa 4
 Grb2: Proteína unida al receptor de factor de crecimiento 2
 Gab: Proteína de unión asociada a Grb2
 GS: Glucógeno sintasa
 GSK: Kinasa de la glucógeno sintetasa
 HSL: Lipasa sensible a hormona
 icv: intracerebroventricular
 IR-A: isoforma A (corta) del receptor de insulina
 IR-B: isoforma B (larga) del receptor de insulina
 IRS: sustrato del receptor de insulina
 IKK: Kinasa de IκB
 IKKβ: Complejo β inhibidor de IκK
 IP: Inmunoprecipitación
 ip: Intraperitoneal
 IP7: Inositol pirofosfato
 IR: Receptor de insulina
 IRβ: Subunidad β del receptor de insulina
 iv: Intravenosa
 Jak2: Kinasa activada por Janus
 JNK: Kinasa del extremo N-terminal de c-Jun
 LHA: Área hipotálamica lateral

MAPK: Kinasa activada por mitogenos
 MEK: Kinasa de proteinas kinasa activada por mitogenos
 mRNA: ARN mensajero
 mTOCRC2: Complejo de mTor2
 NPY: Neurpeptido Y
 NTS: Núcleo del tracto solitario
 OB-R: Receptor de leptina
 Ob-Ra: Isoforma corta del receptor de leptina
 Ob-Rb: Isoforma larga del receptor de leptina
 OMS: Organización Mundial de la Salud
 PKC: Proteinas kinasa C
 PDK1: Kinasa de la piruvato deshidrogenasa
 PEPCCK: Fosfoenolpiruvato kinasa
 PH: Dominio proteica de unión a a fosfolípidos.
 PI3K: Kinasa de fosfatidilinositol 3
 PIP2: inositol-(4,5)-fosfato
 PIP3: inositol-(3,4,5)-fosfato
 POMC: Pro-opiomelanocortina
 PTB: Dominio o de unión a fosfotirosinas
 PTEN: Fosfatasa homologa a tensina
 PTP1B: proteina fosfatasa de tirosinas 1B
 PVN: Núcleo paraventricular
 Raf: Proteina protooncogen c-RAF
 Ras: Proteina del Sarcoma de Rata
 RC: Restricción calórica
 ROS: Especies reactivas de oxigeno
 rRNA: ARN ribosómico
 SCN: Núcleo supraquiasmático
 S.E.M.: Error estandar de la media
 SH2: Dominio proteico de unión a fosfotirosinas
 SH3: Dominio de homologia a Src 3
 Shc: Dominio de homología a Src.
 SHIP-2: Fosfatasa de fosfolipidos
 SHP-2: Proteinas fosfatasa de fosfotirosinas
 SOCS-3: supresor de señalización de citokinas
 SNC: Sistema nervioso central
 Stat: Transductor de la señal y activador de la transcripción
 TAG: Triacilgliceroles
 TCA: Ciclo acidos tricarboxilicos
 TLR 2/4: Receptor Toll-like
 TSC2: Proteinas tuberosa esclerotica 2
 UCP-3: proteina desacoplante 3
 VMH: Núcleo ventromedial del hipotalamo
 WHO: Organización Mundial de la Salud

Introducción

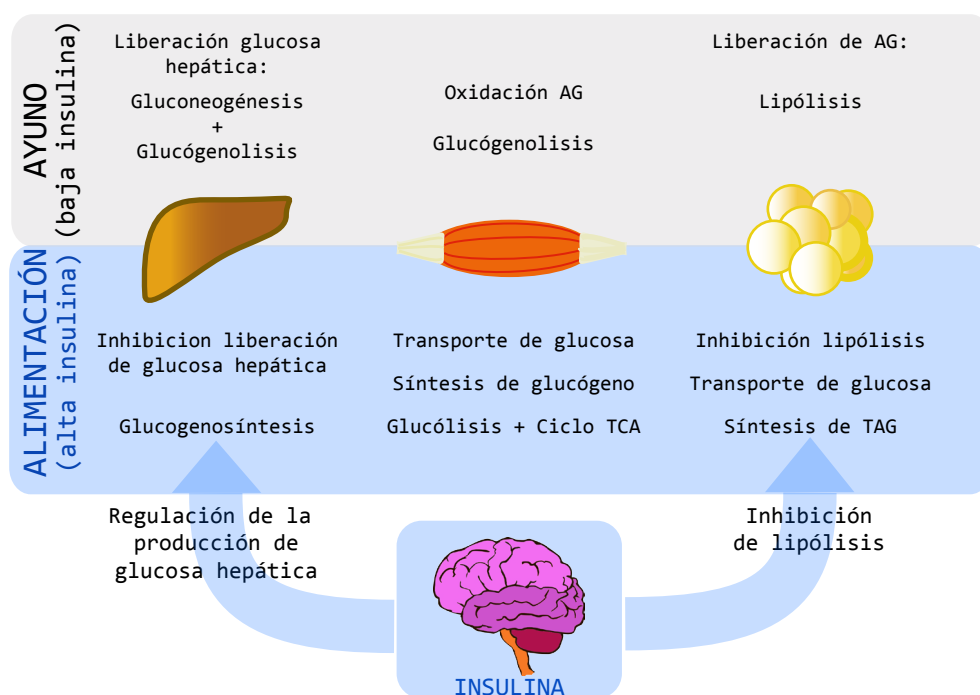
La diabetes tipo II es actualmente una pandemia que ha convertido a esta enfermedad metabólica en la enfermedad no transmisible mas frecuente. Se calcula que en el año 2000 había en el mundo 171 millones de personas mayores de 20 años que padecían diabetes. Las previsiones para el año 2030 cifran en 336 millones de personas diabéticas. De este espectacular incremento, la mayoría se producirá entre la población mayor de 65 años (Wild, S et al., 2004). Debido a su carácter crónico, este incremento de la población diabética provocara un importante aumento de los costes de su tratamiento y en la calidad de vida de los pacientes. El desarrollo de esta enfermedad esta íntimamente relacionado con la obesidad y el desarrollo de la resistencia a insulina, los cuales a su vez están asociados con el envejecimiento (Kahn, BB et al., 2000). El desarrollo de la obesidad implica importantes cambios corporales debido al excesivo acúmulo de lípidos en el tejido adiposo, especialmente en el tejido adiposo visceral (García-San Frutos, M et al., 2007; Huffman, DM et al., 2009). Este incremento de adiposidad asociado al envejecimiento es una característica presente tanto en humanos como en roedores. El tejido adiposo es considerado actualmente como un tejido endocrino debido a su capacidad de secretar factores circulantes que modulan el metabolismo de otros tejidos (Dyck, DJ, 2009; Galic, S et al., 2009). Los factores peptídicos secretados por el tejido adiposo se denominan adipokinas, tales como leptina, adiponectina y resistina. El incremento de adiposidad con la edad está asociado a la sobreproducción de algunos de estos factores. Las adipokinas, especialmente la leptina, se han revelado como factores muy importantes en la regulación del gasto energético y la ingesta de alimento actuando en el cerebro además de en el resto de los tejidos periféricos (Jéquier, E, 2002; Dyck, DJ, 2009). De estos tejidos periféricos destaca el músculo esquelético. Este tejido sensible a insulina es clave en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Galgani, JE et al., 2008). En este trabajo hemos estudiado cómo el envejecimiento afecta a la acción de insulina en el músculo esquelético y la posible implicación de la leptina en este proceso.

1. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA INSULINA

La insulina es un hormona peptídica de 51 aminoácidos secretada por las células β situadas en los islotes de Langerhans del páncreas. El aumento de los niveles de glucosa tras la ingesta de alimento provoca su liberación al torrente sanguíneo. En el organismo adulto la principal función de la insulina es el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Para ello actúa modificando el metabolismo celular de los diferentes tejidos diana promoviendo la captura y el almacenamiento del exceso de glucosa de la sangre (Saltiel, AR et al., 2002). Se ha clasificado la forma de actuación de la insulina en función de los órganos implicados. La acción periférica afecta principalmente al tejido adiposo junto con músculo e hígado, mientras que la acción central hace referencia a su acción en el cerebro, fundamentalmente en el hipotálamo (Schwartz, MW et al., 1992). El esquema 1 muestra los principales efectos de la insulina.

a. Efectos periféricos de la insulina.

La insulina estimula en el músculo esquelético el transporte de glucosa desde el torrente sanguíneo, a través del transportador inducible GLUT-4 (Guma, A et al., 1995; Michelle Furtado, L et al., 2003). A su vez provoca un cambio en el metabolismo celular que favorece el uso de la glucosa como principal sustrato metabólico mediante la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en la mitocondria (Randle, PJ et al., 1994). Además, promueve el almacenamiento del exceso de glucosa en forma de glucógeno que se empleará en situaciones de alta demanda de glucosa o en situaciones de ayuno prolongado (Galgani, JE et al., 2008). En el tejido adiposo, la insulina favorece la captura de glucosa mediante la externalización del transportador GLUT-4. La glucosa es metabolizada para formar glicerofosfatos que serán utilizados como base para la síntesis de triacilgliceroles (TAG), que se acumulan en gotas lipídicas (Mora, S et al., 2002). De esta forma se almacena el exceso de glucosa para futuros usos en momentos de ayuno y/o necesidad. Otra función importante de la insulina en el tejido adiposo es la inhibición de la lipólisis, mediante la inhibición de la actividad de la enzima HSL (Nishino, N et al., 2007). Junto con ello, la insulina tiene acciones lipogénicas, estimulando la síntesis de ácidos grasos (AG) por aumento de la actividad de la ACC (Moustaïd, N et al., 1996). En el hígado, la insulina inhibe rápidamente la gluconeogénesis, mediante la inhibición de la expresión de las enzimas limitantes PEPCK y G6Pasa, y la glucógenolisis, por inhibición de la glucógeno fosforilasa (Yabaluri, N et al.). De esta forma bloquea la secreción de glucosa a la sangre. A su vez la insulina estimula la síntesis de glucógeno favoreciendo la actividad de la GS.



Esquema 1. Efectos periféricos y centrales de la insulina en el metabolismo.

b. Efectos centrales de la insulina.

La insulina ejerce efectos en el sistema nervioso central (SNC) tras atravesar la barrera hematoencefálica. Aunque el receptor de insulina (IR) se expresa en diferentes zonas del cerebro, su principal sitio de acción es el hipotálamo (Marks, JL et al., 1990) y mas específicamente el núcleo arcuato en donde actúa sobre poblaciones de neuronas que modulan efectos anorexigénicos y orexigénicos (Niswender, KD et al., 2003). Dentro del primer grupo se encuentran las neuronas productoras del neuropéptido Y (NPY) y de AgRP, las cuales son inhibidas por la insulina. En el otro grupo se encuentran las neuronas denominadas POMC y CART, las cuales son estimuladas por la insulina dando lugar a la secreción de CART y melanocortina. Estos neuropéptidos, junto con la propia insulina, pueden actuar sobre zonas próximas tales como el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo dorsomedial (DMH), el área hipotalámica lateral (LHA) y el núcleo ventromedial (VMH). Desde estas áreas la señal se transmite mediante neuronas de segundo orden hasta regiones tales como el núcleo del tracto solitario (NTS) y el núcleo supraquiasmático (SCN) (Hillebrand, JJG et al., 2002). En conjunto, la insulina produce una señal anorexigénica, que limita la ingesta de alimento. La acción central de la insulina refuerza la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo y favorece la lipogénesis (Scherer, T et al., 2011). De la misma forma, la acción central de la insulina controla la producción hepática de glucosa (Buettner, C et al., 2005).

c. Mecanismos moleculares de la acción de insulina.

La vía de señalización de la insulina es una vía muy conservada en diferentes tipos de organismos, tales como levaduras, artrópodos y mamíferos (Rincon, M et al., 2004). La acción de la insulina comienza mediante su unión a su receptor específico situado en la superficie celular (Kido, Y et al., 2001). Dicha unión desencadena una serie de cambios en el interior celular mediante patrones específicos espaciales y temporales que dan lugar a respuestas concretas, específicas del tipo celular y de la situación fisiológica del organismo (Cohen, P, 2006; Taniguchi, CM et al., 2006) (Saltiel, AR and Pessin, JE, 2002). Además, se conocen otros efectos que no son integrables en estas vías y cuyos mecanismos están sólo parcialmente descritos. Las principales vías de señalización celular de la insulina estan recogidas en el esquema 2.

i. Vía metabólica de la señalización de la insulina.

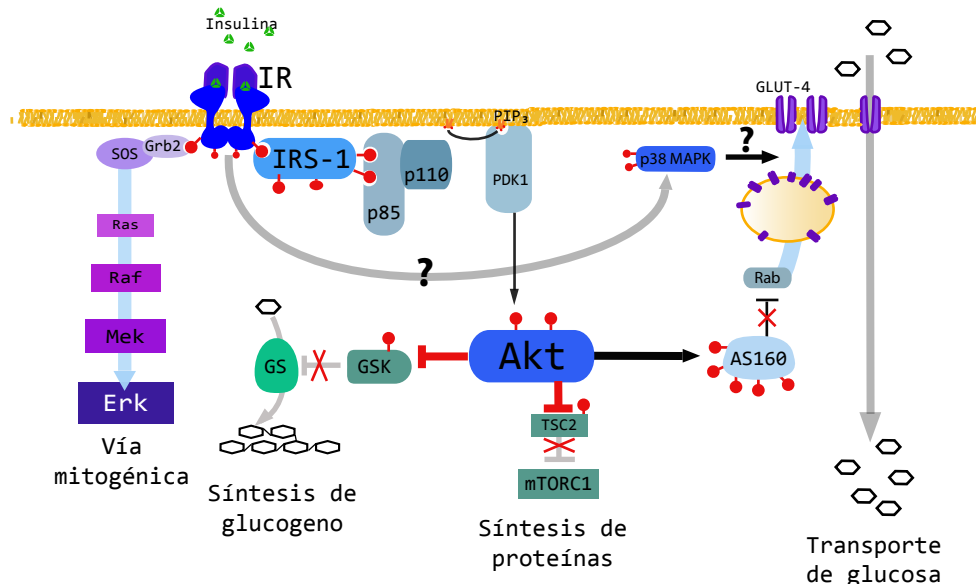
El IR pertenece a la familia de los receptores tirosina kinasa y esta formado por dos subunidades, α y β , unidas entre sí mediante un puente disulfuro (Schlessinger, J, 2000; Kido, Y et al., 2001). La subunidad α es totalmente extracelular, mientras que la subunidad β tiene un pequeño dominio extracelular, una región transmembrana y una dominio intracelular que posee actividad tirosina kinasa. El IR se expresa en la membrana de las células como un dímero $(\alpha\beta)_2$. La actividad tirosina kinasa solo es funcional tras la unión de una molécula de insulina a la subunidad α , que provoca cambios conformacionales que permiten la autofosforilación cruzada de los residuos de tirosina de las subunidades β . La fosforilación en tirosina mantiene la funcionalidad de la actividad kinasa y a su vez crea sitios específicos de unión para otras proteínas. De esta forma se crea un punto de ramificación y la

transducción de la señales puede ocurrir a través de diferentes vías. Se ha caracterizado la expresión de dos isoformas diferentes del IR generadas por *splicing* alternativo. Las isoformas IR-A e IR-B se diferencian en la presencia en IR-B de 12 aminoácidos en la región carboxilo terminal de la subunidad β , correspondientes al exón 11, que están ausentes en la forma IR-A (Seino, S et al., 1989; Serrano, R et al., 2009) Se ha propuesto por varios autores que estas características del IR permitirían una mejor regulación espacio temporal de la acción de insulina (Whitehead, JP et al., 2000; Saltiel, AR and Pessin, JE, 2002).

Las proteínas principales que se asocian con IR β se denominan IRS. Esta familia de proteínas se caracteriza por tener un dominio PH, de unión a fosfolípidos de la membrana plasmática, seguido de un dominio PTB, que permite su unión a residuos fosforilados de tirosina. De esta forma reconoce y se une específicamente a los residuos fosforilados de tirosina de IR β . Una vez unida, la proteína IRS puede ser fosforilada en sus residuos de tirosina por la propia IR β . La fosforilación en determinados residuos de tirosina sirve como lugar de unión de otras proteínas con dominios SH2 (Ogawa, W et al., 1998; Thirone, ACP et al., 2006). Junto con la fosforilación en tirosina se ha descrito la posibilidad de que algunos residuos de serina de IRS sean fosforilados por serina/treonina kinasas tales como JNK, PKC noveles o el complejo IKK (Gao, Z et al., 2002). Está ampliamente aceptado que la fosforilación en determinados residuos de serina de las IRS bloquea la continuidad de la señal de insulina (Whitehead, JP et al., 2000; García-San Frutos, M et al., 2007). Esto sugiere que las funciones de IRS pueden ser moduladas en función de la fosforilación de determinados residuos (Sun, XJ et al., 2009). Se han caracterizado hasta 6 isoformas de IRS. De ellas las más estudiadas son IRS-1 e IRS-2. La función de las isoformas IRS-3 e IRS-4 es menos conocida, pero se sabe que IRS-3 se expresa principalmente en adipocitos (Villar, M et al., 2006). Recientemente se han descrito dos nuevas isoformas IRS-5 e IRS-6, que presentan menos homología con el resto de la familia y cuyas funciones son aun desconocidas (Cai, D et al., 2003). Las isoformas IRS-1 y -2 intervienen de forma fundamental en procesos metabólicos, como se ha demostrado mediante su eliminación en modelos de ratones *knockout* (Kadowaki, T, 2000; Thirone, ACP et al., 2006). Múltiples estudios coinciden en sugerir que IRS-1 e IRS-2 tienen diferentes funciones, específicas de tejido (Valverde, AM et al., 1998). IRS-1 ha sido propuesta como la principal encargada de transmitir la señal de insulina que regula las respuestas metabólicas de la célula (Thirone, ACP et al., 2006; Haeusler, RA et al., 2008).

La fosforilación de IRS-1 en los residuos Tyr⁶⁰⁸ y Tyr⁹³⁹ genera dos sitios específicos que son reconocidos por los dominios SH2 de la subunidad p85 de PI3K. La PI3K es una proteína compuesta por una subunidad reguladora (p85) y una catalítica (p110) que fosforila al compuesto fosfatidilinositol-(4,5)-fosfato (PIP₂) de la cara interna de la membrana plasmática y genera fosfatidilinositol-(3,4,5)-fosfato (PIP₃) (Shepherd, PR, et al., J 1998). El PIP₃ es reconocido por proteínas con dominio PH a las que atrae hasta la membrana plasmática. La proteína PDK1 reconoce a PIP₃ y es reclutada a las inmediaciones del IR en la membrana plasmática. Otra proteína con dominio PH que es reclutada por PIP₃ es Akt.

Esta proteína es una serina/treonina kinasa implicada en múltiples procesos moleculares y un punto clave en la señalización de insulina (Manning, BD et al., 2007). Akt resulta fosforilada primero en su residuo Thr³⁰⁸ por PDK1 y posteriormente en su residuo Ser⁴⁷³ por el complejo mTORC2 (Hay, N, 2010). Akt fosforila e inhibe a GSK3. Esta kinasa mantiene inactiva, mediante fosforilación, a la GS encargada de la síntesis de glucógeno (Mora, A et al., 2005). Akt también fosforila a proteínas de la familia FOXO, lo que produce su translocación al citoplasma y posterior degradación (Matsuzaki, H et al., 2003). Otra diana de Akt es TSC2, lo que favorece la des inhibición de mTORC1 y favorece la síntesis de proteínas (Haar, EV et al., 2007). Por último, Akt fosforila a AS160, proteína que inhibe al intercambiador de nucleótidos Rab. Esto desencadena una cascada de señalización que provoca la exocitosis de GLUT-4 (Zeigerer, A et al., 2004). Las moléculas de GLUT-4 se encuentran retenidas en vesículas especializadas cerca de la membrana plasmática en situación basal. Tras la estimulación de la célula con insulina, estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática en un proceso que implica a proteínas propias de los *lipids rafts* como v-SNARE, VAMP2 y caveolina (Chang, L et al., 2004; Schwenk, RW et al., 2010). De esta forma, la insulina induce la externalización de GLUT-4 y el consiguiente aumento del transporte de glucosa. Los estudios sobre el comportamiento de GLUT-4 han mostrado que la insulina no solo induce su translocación a la membrana, sino que también reduce su velocidad de endocitosis. Esto favorece la exposición del transportador al espacio extracelular y maximiza la captura de glucosa (Martin, OJ et al., 2006; Klip, A, 2009).



Esquema 2. Acciones intracelulares de la insulina.

La unión de la insulina al IR inicia una cascada de señalización a través de diferentes vías que le permite modular diversos procesos. La vía metabólica señala a través del eje IR β /IRS-1/Akt, lo que modula la exocitosis de GLUT4 o la estimulación de la síntesis de glucógeno y de proteínas. En cambio, la vía mitogénica señala a través del eje IR β /Grb2/Sos/Ras/raf/Mek/Erk. Además existen otras acciones de la insulina cuyos mecanismos celulares aun no estan descritos completamente.

ii. Vía mitogénica de la señalización de insulina.

Se ha descrito la interacción entre IR β y otras proteínas diferentes de las IRS, tales como Grb-2, cbl-c, Shc o Gab (Kanzaki, M et al., 2001; Van Obberghen, E et al., 2001). A través de estas interacciones la insulina puede modular otras respuestas celulares diferentes de las producidas por la vía IRS-1/PI3K/Akt. Una de ellas es la señalización mitogénica de la insulina a través de la vía de las MAPK (Denton, RM et al., 1995; Osman, AA et al., 2000; Molero, JC et al., 2002). Esta vía de señalización comienza con la unión de Grb2 a través de su dominio SH2 sobre residuos de tirosina fosforilados de IRS o de Shc, cuando estas proteínas se encuentran unidas a IR β (Yamauchi, K et al., 1994). Grb2 recluta a la proteína Sos mediante sus dominios SH3 y esta última promueve la activación de Ras (Skolnik, EY et al., 1993). A partir de su activación se inicia una cascada de señalización de kinasas que implica a Raf, MEK y finalmente a las Erk, que son proteínas de la clase MAPK. Al ser fosforiladas, las Erks se translocan al núcleo donde activan la transcripción de diferentes genes.

iii. Otras vías implicadas en la señalización de la insulina.

Tras conocer que la señal de insulina afecta a las MAPKs, Erk1 y Erk2, varios grupos investigaron si la misma señal podría activar a otras MAPK, como JNK y p38. Estos estudios descartaron la relación entre insulina y JNK, pero encontraron una relación entre la señalización de insulina y la activación de p38 (Kayali, AG et al., 2000). Esta proteína es una kinasa serina/treonina que está implicada en la respuesta al estrés celular y a estímulos como la radiación UV, cambios en la osmolaridad y respuesta a citokinas (Han, J et al., 1994). Esta proteína es activada por kinasas como MEK3 y MEK6 que la fosforilan en los residuos Thr¹⁸⁰ y Tyr¹⁸². Una vez activa, p38 puede translocarse al núcleo donde estimula a factores de transcripción como ATF-1, Sap-1 y proteínas como p53, aunque también puede ejercer otros efectos en el citoplasma (Roux, PP et al., 2004). Otros grupos describieron en modelos *in vitro* como el bloqueo de la activación de p38 mediante inhibidores específicos alteraba el transporte de glucosa inducido por insulina (Sweeney, G et al., 1999; Konrad, D et al., 2001; Somwar, R et al., 2001b). Sin embargo, varios autores demostraron que parte de estos resultados parecían ser un artefacto experimental producido por un posible efecto secundario del inhibidor empleado, el SB208035, que la unirse directamente a GLUT4, impediría el transporte de glucosa (Fujishiro, M et al., 2001; Godl, K et al., 2003; Antonescu, CN et al., 2005; Bazuine, M et al., 2005; Ribé, D et al., 2005). Por el contrario, otros trabajos han propuesto que la activación de p38 es necesaria para la activación de GLUT4 posterior a su translocación a la membrana plasmática inducida por insulina (Michelle Furtado, L et al., 2003; Niu, W et al., 2003). Otros grupos han estudiado el papel de p38 como marcador de inflamación de adipocitos de pacientes obesos y su relación con el descenso en la acción de insulina en los mismos (Carlson, CJ et al., 2003; Koistinen, HA et al., 2003).

2. RESISTENCIA A INSULINA.

Los trabajos de Yalow y Berson demostraron que los niveles de insulina estaban elevados en pacientes con diabetes (Yalow, RS et al., 1960). Esto permitió postular la hipótesis de que el desarrollo de una resistencia sistémica a la acción de la insulina es previo al inicio de la diabetes tipo II. Continuando con esta idea, numerosos grupos han relacionado el desarrollo de la resistencia a insulina con el envejecimiento, la obesidad y la inflamación (Cases, JA et al., 2000; Kahn, BB and Flier, JS, 2000; Barbieri, M et al., 2001).

La resistencia a insulina se define como la disminución de los efectos provocados por la hormona en sus tejidos diana. Está considerada como una característica común en numerosas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo II, la obesidad, la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares. (Reaven, GM, 1995; Facchini, FS et al., 2001; Hotamisligil, GS, 2006).

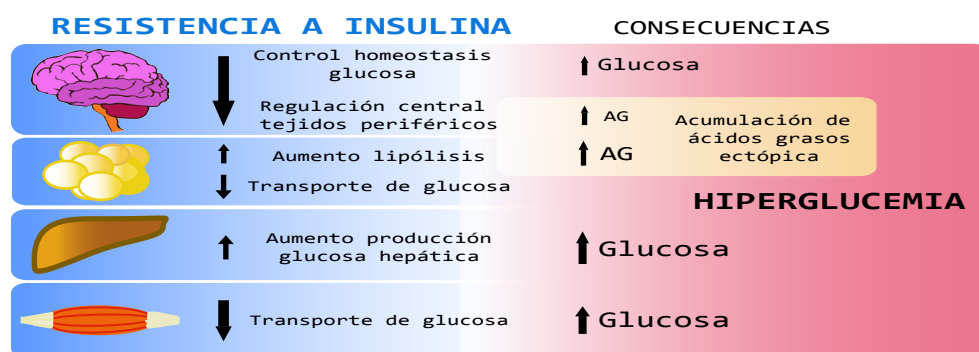
El desarrollo de la resistencia a insulina ha sido ampliamente estudiado en humanos y en modelos experimentales, principalmente en roedores (Ai, J et al., 2005). Muchos de estos trabajos se han centrado en el papel de la edad en la aparición de la resistencia a insulina, utilizando métodos lo más fisiológicos posibles, como el *clamp* euglicémico-hiperinsulinémico, o índices de sensibilidad a insulina (Wallace, TM et al., 2004; Muniyappa, R et al., 2008). La mayor parte de estos estudios han demostrado que existe una asociación entre el desarrollo de resistencia a insulina y la edad, si bien diversos autores postulan que son los cambios en la composición corporal, principalmente el incremento de la adiposidad visceral, los responsables de esta resistencia (Ferrannini, E et al., 1996; Barzilai, N et al., 1997). Por otra parte, en numerosos trabajos se ha demostrado que la resistencia puede inducirse fácilmente mediante alteraciones en la dieta. Así, las dietas con alto contenido graso inducen el desarrollo de resistencia a insulina y constituyen un modelo experimental para su estudio (Hansen, PA et al., 1998; Bernard, JR et al., 2006; Hirabara, SM et al., 2007; Yaspelkis, BB, 3rd et al., 2009). Puede afirmarse que estos estudios apoyan la idea de que son los cambios corporales los que tienen un papel fundamental en la aparición y progresión de la resistencia a insulina durante el envejecimiento. No obstante, estudios en humanos no obesos ha puesto de manifiesto que la resistencia a insulina puede aparecer también con la edad en ausencia de cambios relevantes en la adiposidad (Kahn, BB and Flier, JS, 2000).

a) Desarrollo de la resistencia a insulina periférica.

El desarrollo de la resistencia a insulina es progresivo y está influido por factores tanto genéticos como ambientales (Vijg, J et al., 2005). Su principal consecuencia es la alteración de la homeostasis de la glucosa. Esto se debe fundamentalmente a la disminución del transporte de glucosa estimulado por insulina en los tejidos diana, principalmente en el músculo y en el adiposo. La persistencia de altos niveles de glucosa en sangre tras la ingesta es percibida por las células β del páncreas, que intentan compensar la hiperglucemia secretando mayores cantidades de insulina. Esto provoca el desarrollo de un estado hiperinsulinémico, que a la larga no es suficiente para mantener la

captura de glucosa alcanzándose una situación de intolerancia a la glucosa, la cual puede acabar en diabetes (hiperglucemia en ayunas). Durante la compensación hiperinsulinémica las células β sufren un deterioro progresivo y finalmente entran en apoptosis, dando lugar a una situación diabetes con dependencia de insulina (Saltiel, AR, 2001; Kasuga, M, 2006).

Aunque la resistencia a insulina puede tener diversos orígenes, tal como atestiguan los estudios con ratones *knockout* del IR específicos de tejido, en el caso de la resistencia asociada a cambios en el nivel de adiposidad, causada por dieta grasa, obesidad o envejecimiento, existen datos abundantes que sugieren que ésta se inicia en el tejido adiposo, apareciendo posteriormente en otros tejidos periféricos como el músculo (Smith, U, 2002). En el tejido adiposo, la resistencia a insulina provoca una alteración de la liberación de AG y adipokinas en el torrente circulatorio, que pueden afectar al metabolismo celular de otros órganos (Yu, Y-H, 2005; Shell, H et al., 2008). Recientemente se ha descrito que la resistencia a insulina en el corazón, provoca disfunción cardíaca y esteatosis entre otras complicaciones, y en el endotelio, favorece la disfunción endotelial. La resistencia a insulina se considera hoy en día como un marcador de enfermedades cardiovasculares (Ginsberg, HN, 2000; Murdolo, G et al., 2006; Van Gaal, LF et al., 2006).



Esquema 3. Consecuencias del desarrollo de resistencia a insulina.

La prolongación en el tiempo de la alteración de la sensibilidad a insulina provoca un aumento de los niveles de glucosa y de AG en sangre, lo que favorece el almacenamiento ectópico de estos últimos.

b) Bases moleculares de la resistencia a insulina.

Actualmente no se sabe con certeza cuáles son las causas desencadenantes de la resistencia a insulina, aunque la mayoría de las alteraciones moleculares se han localizado en la zona proximal de su vía de señalización. Muchos trabajos, entre ellos de nuestro grupo de investigación, han demostrado alteraciones del IR, tanto en su expresión como en su función. Aparte de algunas mutaciones puntuales, asociadas a situaciones de resistencia severa a la insulina (Hegele, RA, 2003), se ha descrito la disminución de la expresión de su mRNA y de la cantidad de proteína con la edad en células de tejido adiposo y en pacientes diabéticos. Otros trabajos han descrito igualmente un descenso en la actividad kinasa del IR (Carrascosa, JM et al., 1989; Youngren, JF, 2007).

Esta reducción se hace extensible al nivel de fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas IRS. Una de las causas descritas para este proceso es el aumento de la actividad de determinadas fosfatasa, tales como PTP-1B o SHP2 (Byon, JC et al., 1998; Kennedy, BP et al., 2000; Mussig, K et al., 2005). Estas proteínas parecen ser las encargadas de modular la terminación de la señal de insulina, y en determinados escenarios fisiológicos, su aumento de actividad podría contribuir al descenso de la transmisión de la señal hormonal (González-Rodríguez, A et al., 2010).

Tanto IRS-1 como IRS-2 han sido ampliamente estudiadas y se ha propuesto que la resistencia a insulina celular está relacionada con el aumento de los niveles de fosforilación en sus residuos de serina (Boura-Halfon, S et al., 2009). Trabajos de sobreexpresión de mutantes de IRS-1 en los que los residuos de serina son sustituidos por alanina describen una reversión de la resistencia a insulina sistémica, aunque la sobreexpresión sea localizada solo en el músculo esquelético (Morino, K et al., 2008). Igualmente se ha descrito una alteración en la localización celular de distintas isoformas de IRS-1 en adipocitos de ratas envejecidas (Villar, M et al., 2006). Hay indicios de que proteínas de estrés celular como JNK o el complejo IKK β fosforilan a IRS en serina (Gao, Z et al., 2002; Tanti, JF et al., 2004). Estas proteínas pueden activarse ante un proceso de inflamación. En el caso del tejido adiposo se ha descrito en múltiples trabajos el desarrollo de un nivel de inflamación subcrónico y su relación con el desarrollo de resistencia a insulina (Arkan, MC et al., 2005; Horrillo D, et al., 2011). Sin embargo, recientemente se han publicado trabajos que describen cómo la fosforilación en determinados residuos de serina no es siempre un regulador negativo de la señalización de la insulina. En el caso del residuo Ser³⁰⁷ de IRS-1, su fosforilación es necesaria para el mantenimiento de la sensibilidad a insulina (Copps, KD et al., 2010; Koch, C et al., 2010).

La modulación de la fosforilación de IRS puede alterar su interacción con PI3K, reduciendo su activación (Friedrichsen, M et al., 2010). Otros moduladores negativos de la señal de insulina son las fosfatasa PTEN y SHIP2, que pueden desfosforilar a PIP₃ (Clement, S et al., 2001; Vinciguerra, M et al., 2006). Recientemente se ha aislado otro regulador negativo de la señalización de insulina. En este caso, se trata de la forma hiperfosforilada del inositol, denominada inositol pirofosfato o IP7. Según los autores, este compuesto puede secuestrar a Akt a través de la unión con su dominio PH y evitar que se una a PIP₃, lo que bloquea la transducción de la señal de insulina (Chakraborty, A et al., 2010). El descenso de la señalización al nivel de Akt en la vía de transducción de la señal de insulina puede causar un descenso de la cantidad de GLUT-4 translocado a la membrana plasmática y una menor captura de glucosa, lo que favorece en última instancia un aumento de la concentración de glucosa en sangre.

Múltiples trabajos han observado un descenso de la expresión de GLUT-4 en adipocitos en pacientes con diabetes tipo II (Smith, U et al., 1999). En conjunto, los defectos celulares de la transmisión de la señal de insulina provocan un descenso de su acción en los tejidos diana. Esto conlleva una alteración que de importantes procesos metabólicos como la inhibición de lipólisis y la producción de glucosa hepática, dando lugar a una alteración de la homeostasis de la glucosa.

3. METABOLISMO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

El músculo esquelético es un tipo de músculo estriado caracterizado por formarse a partir de células multinucleadas, que se organizan en fibras musculares, y éstas en paquetes musculares que se unen a los huesos del esqueleto mediante tejido conectivo. Su principal función es mantener unidas las diferentes partes del esqueleto y permitir el movimiento del organismo, para lo cual necesita un alto aporte de energía. El músculo esquelético que es el principal órgano consumidor de glucosa después del cerebro, captando hasta el 70% de la glucosa circulante tras la ingesta de alimento (DeFronzo, RA et al., 1985; Zierath, JR et al., 2000).

La principal fuente de energía del músculo procede de la glucólisis aerobia o la oxidación de AG en la mitocondria. El uso de uno u otro combustible depende de la situación del organismo y del músculo (Randle, PJ, 1998). Durante el ayuno el músculo oxidativo usará preferentemente AG captados del torrente sanguíneo como fuente de energía (Saltiel, AR et al., 2001). El músculo esquelético es capaz de acumular AG en forma de TAG en gotas de grasa. Además, el músculo también almacena glucógeno para obtener glucosa rápidamente en situaciones de alta necesidad energética, como es el caso del ejercicio rápido. Tras la ingesta de alimento y en respuesta a la acción de la insulina circulante, el músculo captura glucosa mediante el transportador GLUT-4. Esta glucosa pueden utilizarse para generar energía mediante su glucólisis o para reponer los almacenes de glucógeno y lípidos.

Las fibras de músculo esquelético se clasifican en función de sus propiedades contráctiles, que reflejan el tipo de metabolismo de la fibra (Barnard, RJ et al., 1971; Bottinelli, R et al., 2000)

- Fibras de tipo I: Tienen un metabolismo oxidativo y forman mayoritariamente los denominados músculos rojos, debido a su alta irrigación y contenido mitocondrial. Tienen una alta capacidad para almacenar lípidos. Se denominan también fibras de contracción lenta y responden mejor a demandas energéticas sostenidas en el tiempo.
- Fibras de tipo II: Tienen un metabolismo predominantemente anaeróbico, y presentan un contenido menor de mitocondria y lípidos almacenados. Son fundamentales en esfuerzos intensos y de corta duración. Se pueden clasificar en varios subtipos, tales como fibras IIa, IIb y IIx, según su capacidad de contracción mas o menos veloz.

a) Acción de la insulina en el músculo esquelético.

Debido a su especialización metabólica, las fibras musculares muestran diferente sensibilidad a la acción de insulina. Las fibras de tipo I son más sensibles a su acción debido a una actividad tirosina kinasa intrínseca del IR más elevada (James, DE et al., 1986) y a la mayor expresión de algunas enzimas implicadas en la transducción de la señal de insulina. Dichas fibras presentan también una mayor abundancia de transportadores de glucosa (Marette, A et al., 1992; Song, XM et al., 1999). A su vez, el metabolismo lipídico del músculo se ve modificado tras la acción de la insulina, favoreciendo la lipogénesis y el almacenamiento de TAG en el interior de gotas lipídicas (Goodpaster, BH et al., 2004). En humanos, la cantidad de lípidos intramiocelulares está elevada en músculos de individuos obesos. Esta correlación ha permitido sugerir que el nivel de lípidos almacenados sirve como marcador de la sensibilidad a insulina del músculo (Krssak, M et al., 1999).

b) Desarrollo de la resistencia a insulina en el músculo.

El desarrollo de resistencia a insulina en músculo provoca un importante descenso en la capacidad de transportar glucosa (Abdul-Ghani, MA et al., 2010). Las causas del desarrollo de esta resistencia en este tejido aun son desconocidas, pero se han postulado dos teorías: la lipotoxicidad y la pérdida de función de la mitocondria. Ambas teorías no son excluyentes y parecen estar interconectadas.

Ante un aumento de los AG circulantes, consecuencia de la edad, del incremento de adiposidad, de una dieta rica en grasas o a una alteración del metabolismo del tejido adiposo, los demás tejidos periféricos pueden aumentar su captura en un intento de disminuir la hiperlipidemia (Halseth, AE et al., 2000; Sell, H et al., 2006). Las fibras musculares de tipo I tienen mayor capacidad de transportar AG al interior celular (Bonen, A et al., 1998) donde un excesivo acúmulo intracelular de AG puede modificar el equilibrio de uso entre éstos y la glucosa e interferir en la oxidación de esta última (Randle, PJ, 1998). El exceso de almacenamiento de lípidos provoca lipotoxicidad asociada al aumento de especies lipídicas derivadas de su metabolismo, entre las que destacan el diacilglicerol y las ceramidas (Lelliott, C et al., 2004; Coen, PM et al., 2009). Estos compuestos provocan la activación de las denominadas PKC noveles, que son kinasas específicas de serinas/treoninas, que pueden fosforilar a las IRS y bloquear la señal de insulina (Schmitz-Peiffer, C, 2000; Dey, D et al., 2006; Koves, TR et al., 2008). Un exceso de AG intracelular puede inducir un incremento en los niveles de malonil-CoA, que es un inhibidor de la CPT-1B, proteína encargada del transporte de los ácidos-CoA al interior de la mitocondria (Abu-Elheiga, L et al., 2001). De esta forma, se reduce la oxidación de AG en el interior de la mitocondria, con lo que se disminuye su eficacia y se favorece el acúmulo citoplasmático de especies relacionadas. Además el exceso de AG circulantes puede inducir una respuesta de estrés celular señalizando a través del TLR2 y TLR4, lo que activa a JNK y el complejo IKK β . Estas serinkinasas pueden también fosforilar los residuos de serina de IRS-1 contribuyendo al descenso de la acción de insulina (Gao, Z et al., 2004; Arkan, MC et al., 2005).

La teoría de la disfunción mitocondrial sostiene que el inicio de la resistencia a insulina se encuentra en la progresiva pérdida de la funcionalidad mitocondrial del músculo y en el descenso de su número (Civitarese, AE et al., 2008; Kim, J-A et al., 2008). Esto se asocia con la oxidación incompleta de los AG en su interior y la reducción de la eficiencia del ciclo del TCA junto con un aumento de ROS. Esto provoca un acúmulo de aciles-CoA en el citoplasma y de compuestos lipídicos derivados, entre los que destacan el diacilglicerol y las ceramidas, que activan a las PKC noveles y la fosforilación en serina de IRS. A la vez, el aumento de los niveles de ROS producidos en la mitocondria puede activar las vías de estrés celular, lo que provoca la activación de la JNK y del complejo IKK β , como se ha mencionado anteriormente (Iossa, S et al., 2004).

4. LA LEPTINA.

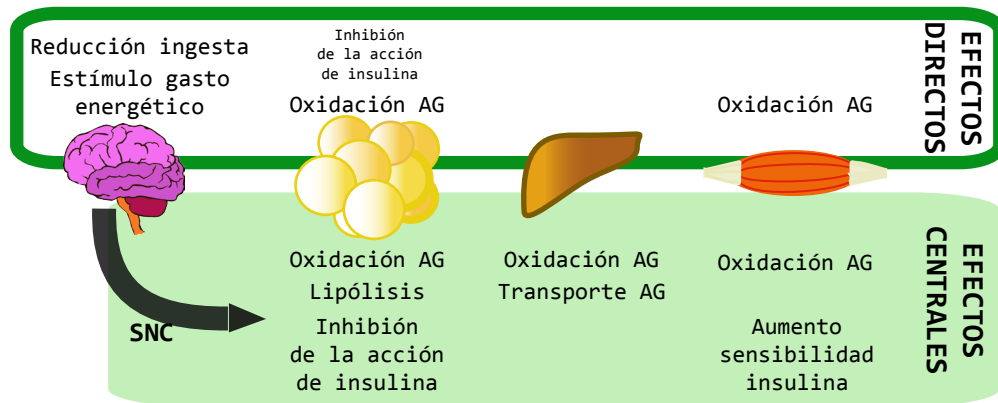
La leptina es un péptido de 167 aminoácidos sintetizado y secretado por el adipocito. La existencia de un factor de control adipostático fue postulada en 1953 por Kennedy (Kennedy, GC, 1953). Douglas Coleman, a partir de observaciones en ratones genéticamente obesos, denominados *ob/ob* y *db/db*, la identificó como una molécula secretada por el tejido adiposo (Coleman, DL, 2010). Fue aislada y caracterizada por el laboratorio del Dr. Friedman en 1994 mediante clonaje posicional (Zhang, Y et al., 1994; Flier, JS et al., 2010). Su administración exógena a ratones *ob/ob*, que carecen de leptina endógena, produce la reversión del fenotipo obeso (Halaas, JL et al., 1995), por lo que se postuló que la leptina regula el gasto energético a largo plazo y controla el exceso de lípidos mediante la reducción de la ingesta y el aumento del consumo energético (Maffei, M et al., 1995; Friedman, JM et al., 1998). Se ha descrito que su nivel en suero se correlaciona con la cantidad de tejido adiposo en humanos y roedores (Considine, RV et al., 1996; Porte, D, Jr. et al., 1998)

a) Funciones fisiológicas de la leptina.

El descubrimiento y clonación del receptor de leptina, denominado Ob-R, permitió localizar las zonas donde se expresa preferentemente. El Ob-R se expresa mayoritariamente en cerebro, específicamente en el hipotálamo, lo que indica que la leptina ejerce una acción central, la cual ha sido ampliamente estudiada (Lee, GH et al., 1996; Bates, SH et al., 2003; Sahu, A, 2004).

El efecto de la leptina sobre la ingesta de alimento es similar al de la insulina. La leptina señala en zonas del hipotálamo con mayor expresión del Ob-R, tales como los núcleos PVN, ARC, DMH y VMH. Su acción estimula las neuronas anorexigénicas POMC y CART a la vez que inhiben la liberación de neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP, dando lugar a la reducción de la ingesta (Myers, MG et al., 2009). Junto a este efecto, la leptina modula el metabolismo de los órganos periféricos mediante una señal eferente transmitida a través del SNC (Belgardt, BF et al.) y el sistema nervioso autónomo (Bartness, TJ et al., 2010). De esta forma la leptina central estimula el gasto energético en los tejidos periféricos para reducir los excedentes de lípidos almacenados.

Múltiples trabajos publicados han demostrado que las acciones de la leptina son específicas para cada tejido periférico (Wang, JL et al., 1999; Muoio, DM et al., 2002). El esquema 4 recoge los principales efectos de la leptina sobre el organismo.



Esquema 4. Efectos directos y centrales de la leptina sobre el metabolismo. La leptina es secretada por el tejido adiposo y puede actuar directamente sobre los demás tejidos periféricos y en el hipotálamo. Desde el cerebro, a través del SNC, la leptina produce un aumento del consumo energético, principalmente mediante la oxidación de AG en la mitocondria

En el tejido adiposo, la leptina activa la lipólisis por estimulación de la HSL y por aumento de la expresión de enzimas lipolíticas como ATGL, HSL y DAGT-1 (Gallardo, N et al., 2007). A su vez, favorece la oxidación de los AG en la mitocondria por estimulación de AMPK. De esta forma, se produce una reducción de los TAG almacenados sin que se libere en exceso los AG al torrente sanguíneo (Unger, RH, 1997; Buettner, C et al., 2008). A su vez, la señal de leptina provoca una inhibición de la acción de insulina sobre este tejido y reduce la captura de glucosa, lo que evita la formación de TAG (Bonzón-Kulichenko, E et al., 2011).

En el hígado, la leptina central favorece la depleción del exceso de TAG (Fishman, S et al., 2007) a la vez que inhibe la lipogénesis (Huang, W et al., 2006; Kakuma, T et al., 2000; Gallardo, N et al., 2007). Al mismo tiempo, los efectos centrales de leptina aumentan la expresión del transportador de AG, CD36, y de enzimas que promueven la oxidación de los AG capturados procedentes del tejido adiposo. La leptina también influye en el metabolismo de la glucosa en el hígado, mediante la estimulación de la gluconeogénesis por aumento de expresión de las enzimas limitantes G6Pase y PEPCK, a la vez que restringe la glucógenolisis. De esta forma, la acción central de leptina no altera la producción hepática de glucosa. (Gutiérrez-Juárez, R et al., 2004).

Por último, en el músculo esquelético la leptina central aumenta su sensibilidad a insulina y favorece el gasto energético por estimulación de la oxidación de los AG en la mitocondria y también mediante el aumento de la termogénesis a través de la UCP-3 (Muoio, DM et al., 1997; Gomez-Ambrosi, J et al., 1999; Minokoshi, Y et al., 1999; Dulloo, AG et al., 2002; Todd, M et al., 2005; Roman, EA et al., 2009).

Recientemente se ha descrito un nuevo efecto de leptina en el hipotálamo, donde su acción aumenta la sensibilidad a insulina, favoreciendo el control central de la homeostasis de la glucosa (Koch, C et al., 2010). A su vez, la leptina aumenta la sensibilidad a insulina de los tejidos periféricos, lo que favorece el control de la glucemia (Barzilai, N et al., 1997; Minokoshi, Y et al., 1999; Ebihara, K et al., 2001; Berthou, F et al., 2011; German, JP et al., 2011). Sin embargo, nuestro grupo de investigación ha demostrado cómo la acción central de la leptina disminuye la sensibilidad a insulina del tejido adiposo (Bonzón-Kulichenko, E et al., 2011; Pérez, C et al., 2004).

El Ob-R se expresa también en múltiples tejidos periféricos, si bien en menor medida que en el cerebro. Este hecho permite postular que la leptina ejerce efectos directos sobre dichos tejidos independientemente de su acción central. Varios trabajos han confirmado la acción de leptina en diversos tejidos periféricos mediante la activación de Stat3 (Kim, YB et al., 2000) o de la estimulación de la oxidación de lípidos (Minokoshi, Y et al., 2002). Estos y otros resultados sugieren que la leptina podría modular la acción de insulina en los tejidos periféricos mediante su acción directa, independientemente de su acción central, tal como ya se demostró para el caso de los adipocitos aislados (Pérez, C et al., 2004).

Además, varios trabajos han demostrado que la leptina ejerce otros efectos diferentes de la regulación metabólica del organismo (Harvey, J et al., 2003), tales como la regulación de la capacidad reproductora (Chehab, FF et al., 1996), la remodelación del hueso (Karsenty, G, 2001), de la función inmune (Sanchez-Margalet, V et al., 2003) o el desarrollo neuronal (Louis, GW et al., 2007). En todos estos casos la acción de leptina indica al organismo la posibilidad de ejecutar procesos biológicos que requieran un importante gasto energético.

b) Mecanismo molecular de la acción de leptina.

La leptina inicia su señal mediante su unión al receptor específico, Ob-R. Dicho receptor es miembro de la familia de receptores de citokinas y carece de actividad kinasa. Hasta el momento se han descrito 6 isoformas del Ob-R, de las cuales destacan las isoformas Ob-Ra y Ob-Rb, generadas por *splicing* alternativo, diferenciándose por la longitud de su región citoplasmática (Hegyi, K et al., 2004; Gallardo, N et al., 2005). La isoforma Ob-Rb es más larga y contiene 3 importantes residuos de tirosina: Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷ y Tyr¹¹³⁸. En el caso del Ob-Ra, su región citoplasmática solo incluye la Tyr⁹⁸⁵ (Villanueva, EC et al., 2008). La transmisión de la señal de leptina se produce mediante la proteína Jak2, que esta unida al dominio citoplasmático del Ob-R (Sweeney, G, 2002; Frühbeck, G, 2006). Jak2 se activa tras la unión de una molécula de leptina al Ob-R, pudiendo entonces autofosforilarse y fosforilar específicamente los residuos de tirosina antes mencionados. Cada uno de estas fosfotirosinas sirve de punto de reconocimiento específico para diferentes proteínas que transducen la señal de leptina. La fosforilación del residuo Tyr¹¹³⁸ es reconocida por Stat3, mientras que la de Tyr¹⁰⁷⁷ es reconocida por las proteínas Stat5 y SHP2 (Vaisse, C et al., 1996; Gong, Y et al., 2007; Mutze, J et al., 2007).

Cuando las proteínas Stat se unen al Ob-R, son fosforiladas por Jak2 y de esta forma se permite su dimerización y translocación al núcleo, donde promueven la expresión de los genes específicos.

Los estudios con ratones *knockout* que expresan formas mutantes del Ob-R han permitido caracterizar la función e importancia metabólica de cada residuo de tirosina (Myers MG Diabetes 2010). La eliminación de las tres tirosinas provoca un fenotipo similar al *db/db*, pero que presenta un menor aumento de la glucemia. Esto sugiere que la leptina debe intervenir en el control de la homeostasis global de la glucosa a través de Jak2 y sugiere que esta proteína puede estar implicada en otras vías de señalización iniciadas por leptina (Robertson, S et al., 2010). La eliminación de la Tyr⁹⁸⁵ provoca la pérdida de la señal inhibitoria ejercida por SOCS-3 y produce una hipersensibilidad a la acción de leptina (Mori, H et al., 2004). En cambio la eliminación de los residuos de tirosina que señalizan a través de las proteínas Stat generan ratones con fenotipo obeso. Esto implica que la señalización a través de Stat3 y Stat5 es imprescindible para la adecuada acción de la leptina en el control de la ingesta y el gasto energético (Robertson, S et al., 2010).

De entre los genes activados por leptina destaca SOCS-3. Tras su síntesis, SOCS-3 actúa como un modular negativo de la señal de leptina por unión al residuo Tyr⁹⁸⁵ fosforilado del Ob-R. De esta forma se bloquea la acción de Jak2 y termina la propagación de la señal de leptina (Bjorbaek, C et al., 1998; Emilsson, V et al., 1999; Bjorbak, C, 2000). Otro regulador negativo de la señal de leptina es la fosfatasa PTP1B que puede defosforilar a Jak2 y bloquear la acción de leptina (Zabolotny, JM et al., 2002).

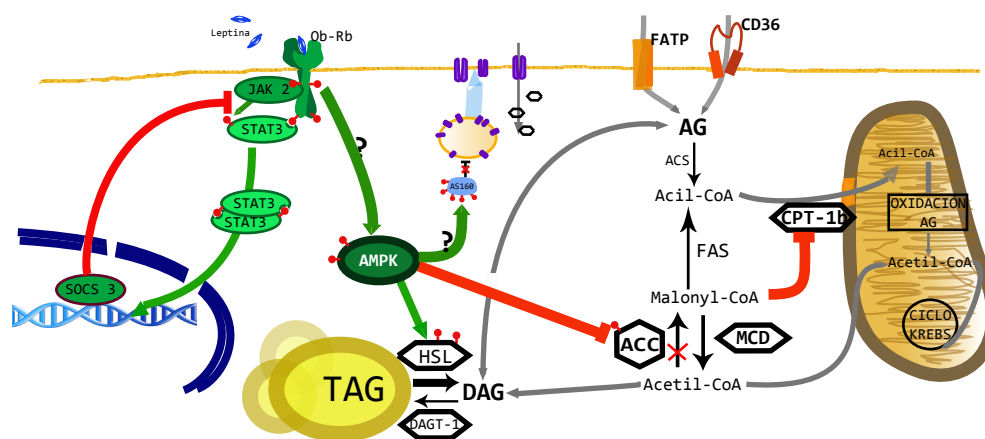
Recientemente se ha descrito la existencia de una interacción entre las vías de señalización de leptina e insulina a nivel de IRS/PI3K (Kim, YB et al., 2000). Según estos trabajos, la leptina promueve la interacción de IRS con PI3K mediante la fosforilación de la primera por Jak2. En trabajos usando células hepáticas se mostró cómo la leptina induce la fosforilación en residuos de tirosina de IRS, aunque otros trabajos no describieron este efecto (Szanto, I et al., 2000; Huang, W et al., 2006). En el caso del hipotálamo, se ha descrito que la leptina puede inducir la fosforilación de IRS y su interacción con PI3K. Sin embargo, la transducción de esta señal no muestra un aumento de la fosforilación de Akt, como sería esperable (Koch, C et al., 2010).

c) Efecto directo de la leptina en el músculo esquelético.

Se ha descrito la expresión del receptor de leptina en el músculo esquelético tanto en humanos como en roedores (Guerra, B et al., 2007; Akasaka, Y et al., 2010). En el músculo, la leptina activa fundamentalmente el metabolismo lipídico, favoreciendo la lipólisis y la oxidación de los AG en la mitocondria (Bjorbaek, C et al., 2004; Dyck, DJ et al., 2006). El mecanismo molecular de dicho efecto implica la estimulación por leptina de la fosforilación de AMPK α (Minokoshi, Y et al., 2002). Esta proteína tetramérica tiene actividad kinasa serina/treonina y actúa como sensor energético de la célula, al activarse cuando la relación ATP:AMP disminuye (Winder, WW et al., 1999). La actividad catalítica se localiza en la subunidad α , y puede fosforilar, entre otros, al

residuo Ser²²¹ de la proteína ACC, encargada de la carboxilación del acetil-CoA. Al ser fosforilada por AMPK, la ACC es inhibida y el nivel de malonil-CoA desciende, lo que hace desaparecer la inhibición de la CPT-1b favoreciendo de esta forma la entrada de AG en la mitocondria y su oxidación (Ceddia, RB et al., 1999a; Abu-Elheiga, L et al., 2001; Todd, M et al., 2005) como se observa en el esquema 5. Aunque se ha demostrado en múltiples modelos y situaciones que la leptina induce la activación de AMPK, aun se desconoce el mecanismo molecular preciso (Janovská, A et al., 2008).

Por otra parte, varios trabajos han descrito la capacidad de la leptina de estimular el transporte de glucosa en el músculo esquelético de forma directa e independiente de la insulina, usando tanto líneas celulares como músculos aislados (Berti, L et al., 1997; Ceddia, RB et al., 1998a; Berti, L et al., 1999; Ceddia, RB et al., 1999b). En paralelo, varios grupos de investigación han estudiado la posible implicación de AMPK en el transporte de glucosa en respuesta a la contracción y han demostrado que este estímulo, independiente de insulina, también produce la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática (Fujii, N et al., 2006). En estas circunstancias, AMPK podría ser activada por la disminución de relación ATP:AMP provocada por el ejercicio físico, y fosforilar a la proteína AS160. Esta ultima proteína parece ser el punto de convergencia con la vía dependiente de insulina de estimulación de la exocitosis de GLUT-4 (Treebak, JT et al., 2006).

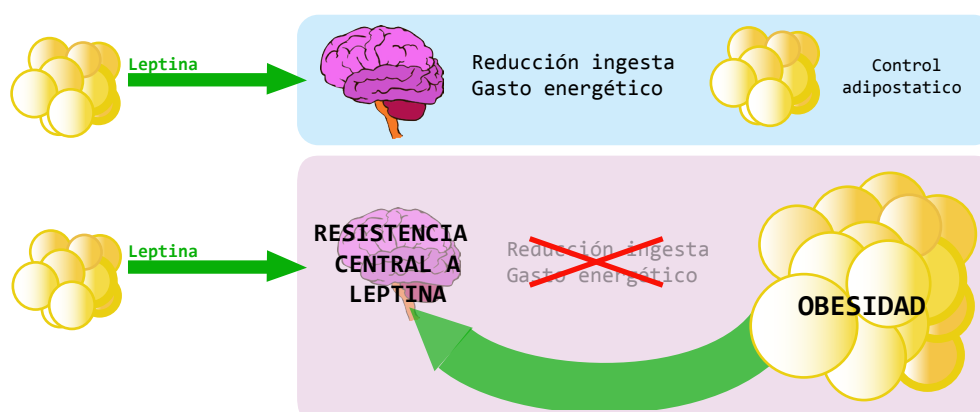


Esquema 5. Señalización de leptina y metabolismo lipídico en el músculo esquelético. La unión de la leptina sobre la isoforma larga del receptor (Ob-Rb) produce la activación de la vía Jak2/Stat3. Al mismo tiempo, mediante un mecanismo aun no descrito, la leptina activa la AMPK, que fosforila e inhibe a la ACC. De esta forma, se reduce la cantidad de malonil-CoA, el cual inhibe a la CPT-1b. De esta forma se favorece la entrada de aciles-CoA al interior de la mitocondria para su oxidación. La AMPK también activa a la HSL, favoreciendo la lipólisis de los TAG almacenados. Además, se ha sugerido que AMPK fosforila a AS160 bajo determinadas condiciones, lo que estimula la exocitosis de GLUT-4. La activación de Stat3 produce la expresión de SOCS-3, que se une al OB-Rb y termina la transmisión de la señal de leptina

Otros trabajos han estudiado la relación de AMPK y p38, proteína de la familia de las MAPK, como posible mecanismo molecular implicado en el aumento de la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético tras el ejercicio físico (Hayashi, T et al., 1998; Lemieux, K et al., 2003; Geiger, PC et al., 2005; Fisher, J, 2006). A partir de estos trabajos se propuso la idea de que AMPK pudiera ser un efector superior de p38 y que ambos están implicados en la estimulación del transporte de glucosa de forma insulina independiente (Hayashi, T et al., 1998; Xi, X et al., 2001; Lemieux, K et al., 2003). Sin embargo, se han publicado algunos trabajos que refutan esta idea usando varios métodos de activación e inhibición de AMPK y comprobando que no hay asociación con la activación de p38 (Ho, RC et al., 2007; Jing, M et al., 2008).

5. RESISTENCIA A LEPTINA

Aunque la función principal de la leptina es actuar como adipostato y regular la cantidad de tejido adiposo, se ha observado que la mayor parte de los pacientes obesos tiene unos niveles muy altos de leptina en sangre, lo cual parece contradecir la idea de la función de leptina como regulador del peso corporal (Frederich, RC et al., 1995; Considine, RV et al., 1996). Los altos niveles de leptina en suero junto con una ingesta normal o incluso mayor en estos individuos llevó a postular la existencia de resistencia a leptina en el hipotálamo (Frederich, RC et al., 1995; Van Heek, M et al., 1997). Multitud de estudios en modelos experimentales han asociado el desarrollo de la resistencia central a leptina y la hiperleptinemia con la obesidad (Halaas, JL et al., 1997; Widdowson, PS et al., 1997) y el envejecimiento (Scarpace, PJ et al., 2001; Fernández-Galaz, C et al., 2002).



Esquema 6. Relación entre la obesidad y la resistencia central a leptina.

El desarrollo de la resistencia central a leptina impide la acción lipostática de esta hormona. Con el progreso del tiempo, el tejido adiposo aumenta su tamaño y secreta mas leptina, que exacerba la resistencia central, formando un círculo vicioso que produce obesidad.

Existen estudios que demuestran que en determinadas situaciones la resistencia a leptina ocurre de forma fisiológica. Estas situaciones se producen, por ejemplo durante el embarazo o en determinados roedores que hibernan (Ladyman, SR, 2008; Tups, A, 2009). Durante estos estados, los organismos favorecen la acumulación de reservas energéticas adicionales antes de iniciar procesos como la hibernación, o afrontar el gasto energético propio de la gestación.

El desarrollo de resistencia central a leptina ha sido extensamente estudiado y se han descrito los principales mecanismos moleculares subyacentes (Münzberg, H et al., 2005). El principal mecanismo celular observado es el aumento de la expresión de SOCS-3 en el hipotálamo, que impide la correcta transducción de la señal de leptina a través de Stat3 (Bjorbaek, C et al., 1998; Wang, Z et al., 2000; Scarpance, PJ et al., 2001; Peralta, S et al., 2002). Junto con el aumento de SOCS-3, otros trabajos han descrito el aumento de la actividad de PTP-1B, fosfatasa que modula negativamente la señalización de insulina y leptina (Kaszubska, W et al., 2002). Trabajos en ratones modificados genéticamente carentes de SOCS-3 y/o PTP-1B en hipotálamo han corroborado estas hipótesis (Mori, H et al., 2004; Briancon, N et al., 2010). Asimismo se han descrito defectos en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica (Kalra, S, 2009) y el descenso de la expresión de sus receptores con la edad como otra posible causa de la disminución de su acción (Fernández-Galaz, C et al., 2001; Scarpance, PJ et al., 2001).

Al igual que ocurre en el hipotálamo, esta resistencia a la acción de leptina parece desarrollarse también en los tejidos periféricos. En el músculo esquelético, se ha descrito como el exceso de lípidos circulantes puede inducir de forma rápida resistencia a la acción directa de leptina (Steinberg, GR et al., 2000). Esta resistencia se manifiesta en un descenso de la oxidación de AG en presencia de leptina (Steinberg, GR and Dyck, DJ, 2000). El posible mecanismos molecular de este proceso incluye la sobreexpresión de SOCS-3, que impide la activación de AMPK por leptina (Steinberg, GR and Dyck, DJ, 2000).

6. INTERACCIÓN ENTRE LA ACCIÓN DE LEPTINA Y DE INSULINA.

Tanto la leptina como la insulina regulan la homeostasis de glucosa y el gasto energético, lo que permite postular que debe existir alguna interacción entre sus respectivos efectos moleculares. En el hipotálamo, ambas hormonas producen una señal anorexigénica actuando sobre las mismas poblaciones de neuronas. Recientemente se ha descrito la necesidad de la señalización de leptina en el hipotálamo para que la insulina pueda regular la homeostasis de la glucosa a través de su acción central. Aunque es necesario continuar investigando este tema, estos resultados podrían indicar la forma en que la resistencia central de leptina induce una desregulación de la homeostasis de glucosa previa al desarrollo de la resistencia global a insulina, siendo el nexo de unión entre la obesidad y la diabetes tipo II (Koch, C et al., 2010).

Como ya se apuntó anteriormente, la acción central de leptina bloquea la acción de la insulina en el tejido adiposo. En células derivadas de hígado se ha publicado una interacción selectiva de leptina sobre la vía de señalización de insulina, donde un tratamiento agudo con leptina previo a la estimulación con insulina produce un aumento de la fosforilación de IRS-1 y su asociación con PI3K a la vez que redujo la fosforilación de IRS-2 y su interacción con PI3K. Esto sugiere que la acción directa de la leptina puede alterar selectivamente la señalización de insulina (Szanto, I and Kahn, CR, 2000).

Varios grupos de investigación se centraron en el estudio de la interacción de los efectos directos de leptina sobre la acción de insulina en el músculo esquelético. Si bien los primeros trabajos sobre la acción *in vitro* de leptina sobre células musculares mostraron un efecto inhibitorio sobre el transporte de glucosa inducido por insulina (Ceddia, RB et al., 1999a; Sweeney, G et al., 2001), otros trabajos en modelos *ex vivo* e *in vitro* mostraron la ausencia de efecto de la leptina sobre la acción de insulina en fibras de músculo y en células musculares (Ceddia, RB et al., 1998a; Fürnsinn, C et al., 1998; Ranganathan, S et al., 1998). Algunos autores han demostrado que la leptina puede tener diferentes efectos en la acción de insulina diferenciando entre efectos agudos (< 2 horas) y efectos crónicos (> 2 horas) en modelos *in vitro* con células L6 (Tajmir, P et al., 2003). Un pretratamiento agudo en estas células bloqueaba parcialmente el transporte de glucosa inducido por insulina, mientras que los tratamientos crónicos no mostraban ninguna inhibición de este transporte, aunque en un trabajo paralelo se describió la colocalización de SOCS-3 con el IR β tras tratamientos crónicos con leptina (Tajmir, P et al., 2003; Eguchi, M et al., 2007). Sin embargo, todavía no se ha alcanzado un consenso sobre cómo afecta la interacción de ambas hormonas en el músculo. Es muy posible que las diferentes conclusiones de los trabajos puedan ser debidas a los diferentes métodos experimentales y modelos de trabajo (Ceddia, RB et al., 2002; Margetic, S et al., 2002).

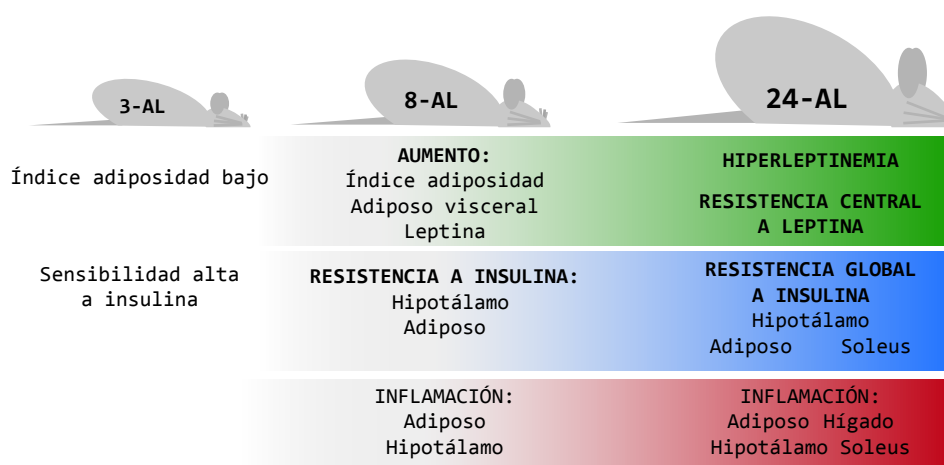
7. RESISTENCIA A INSULINA Y ENVEJECIMIENTO: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA.

El desarrollo de la resistencia a insulina asociada al envejecimiento ha sido ampliamente estudiado, tanto en humanos como en modelos animales. En general puede afirmarse que el envejecimiento va acompañado del desarrollo de resistencia a insulina en tejidos periféricos, que lleva a un estado de mayor o menor intolerancia a la glucosa, lo que puede considerarse como una situación prediabética.

De los diversos trabajos publicados, la mayoría coincide en que el desarrollo de la resistencia global a insulina se debe a varias causas: cambios corporales con la edad, la alteración de respuesta neurohormonal, intervención de factores ambientales y el aumento del estrés oxidativo y la inflamación (Barbieri, M et al., 2001; Basu, R et al., 2003; Muzumdar, R et al., 2008). Nuestro grupo de investigación lleva años estudiando el desarrollo de la resistencia a insulina en un modelo de envejecimiento en rata Wistar. A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el desarrollo de la resistencia a insulina con la edad esta provocado por tres causas relacionadas y cuyo resumen se muestra en el esquema 7.

- i) El aumento de la adiposidad con la edad es una característica presente en humanos y ratas. Este aumento de la adiposidad se localiza en diferentes regiones corporales, siendo el aumento de la grasa visceral el principal factor que provoca la aparición de alteraciones metabólicas durante el envejecimiento. En la rata Wistar se ha descrito el aumento del índice de adiposidad y el índice de Lee de forma significativa a los 8 meses, permaneciendo ambos estables hasta los 24 meses de edad (García-San Frutos, M et al., 2007; Muzumdar, R et al., 2008). La pérdida de regulación propia del tejido adiposo propicia el desarrollo de la resistencia a insulina con la edad, primero en el propio tejido adiposo y luego en el resto de tejidos periféricos (Carrascosa, JM et al. 2011; Escrivá, F et al., 2007; Serrano, R et al., 2009)
- ii) La alteración de la respuesta neuronal a la acción de las señales hormonales ha sido descrita en ratas de edad avanzada (Carrascosa, JM et al., 2009). Estas ratas presentan una resistencia a la acción de leptina en el hipotálamo, debido a un descenso de la expresión del Ob-R y a un aumento de la expresión de SOCS-3 en la región mediobasal del hipotálamo (Fernández-Galaz, C et al., 2001; Peralta, S et al., 2002). Asimismo también se ha descrito el desarrollo de una resistencia a la acción central de insulina en ratas de edad intermedia y avanzada (García-San Frutos, M et al., 2007). Esta alteración provoca la disminución de las señales anorexigénicas y que fomentan el gasto energético, lo que favorece la ingesta y el acúmulo de más lípidos en el tejido adiposo y empeora la regulación central de la homeostasis de la glucosa. El aumento del tejido adiposo a su vez produce mayor secreción de leptina, lo que refuerza este círculo vicioso (Kahn, SE et al., 2006).

iii) El desarrollo de un estado inflamatorio de baja intensidad en el tejido adiposo está asociado al desarrollo de la resistencia a insulina (Hotamisligil, GS et al., 1993). En la rata Wistar, el tejido adiposo comienza a mostrar aumento de marcadores de inflamación desde los 8 meses de edad, el cual coincide con la aparición de resistencia a insulina en este tejido (Horrillo D, et al., 2011). Ese proceso está asociado al incremento de la infiltración de macrófagos, los cuales pueden contribuir a perpetuar este estado de inflamación subcrónica. Otra zona que muestra aumento de los marcadores de inflamación a los 8 meses, aunque de menor intensidad que el tejido adiposo, es el hipotálamo, el cual ya muestra ser resistente a insulina a esta edad (García-San Frutos, M et al., 2007). En cambio, el hígado y el músculo esquelético muestran un aumento de la expresión de mRNA de algunos marcadores de inflamación principalmente a los 24 meses de edad, lo que coincide con el desarrollo de la resistencia a insulina en dichos tejidos.



Esquema 7. Desarrollo de la resistencia a insulina con la edad.

Resumen de las principales alteraciones metabólicas durante el envejecimiento de la rata Wistar

Aunque estos datos y los de otros grupos coinciden en el papel primario de la adiposidad en la resistencia a insulina con el envejecimiento, existen datos que muestran efectos propios del envejecimiento *per se*, como la pérdida de la función mitocondrial (Short, KR et al., 2005) o el aumento de la susceptibilidad del músculo ante un exceso de AG circulantes que propician el desarrollo de la resistencia a insulina (Einstein, FH et al. 2010).

Muchos grupos que estudian el envejecimiento han estudiado en paralelo los efectos en la longevidad de la restricción calórica (RC). Está ampliamente demostrado que la RC produce un aumento de la longevidad en *D. Melanogaster* (Partridge, L et al., 2005), *C. Elegans* (Walker, G et al., 2005) y mamíferos (Das, M et al., 2004; Redman, LM et al., 2010). Aunque se desconocen los mecanismos precisos de estos procesos, varias hipótesis han sido propuestas hasta el momento, tales como la reducción del metabolismo basal, el descenso del nivel de adiposidad o la atenuación del daño oxidativo

(Masoro, EJ, 2005). El efecto de la RC en humanos, debido a su dificultad para homogenizar las condiciones experimentales, sigue siendo controvertido (Phelan, JP et al., 2005; Holloszy, JO et al., 2007). Estos estudios llevaron asociado el descubrimiento de la intervención de algunas proteínas de la familia de las sirtuinas, que poseen función deacetilasa y las cuales intervienen en el proceso de elongación de la longevidad en determinadas circunstancias (Tissenbaum, HA et al., 2001; Michan, S et al., 2007). Este descubrimiento a dado pie a la búsqueda de compuestos que imiten los efectos de la RC sobre la longevidad (Baur, JA et al., 2006)

Muchos de estos estudios han demostrado como la RC mejora la sensibilidad a insulina en varios modelos experimentales, especialmente en roedores (Dean, DJ et al., 2000; Chiba, T et al., 2007; Zheng, Y et al., 2009). Este aumento de sensibilidad a insulina ha sido intensamente estudiado en el músculo esquelético, en donde la RC mejora notablemente la señalización de insulina (Kelley, DE et al., 2001; Barazzoni, R, 2005; McCurdy, CE et al., 2005). Resultados obtenidos por varios grupos coinciden en la relación entre la mejora de la sensibilidad a insulina tras la reducción del tejido adiposo visceral mediante RC (Barzilai, N et al., 1998; Catalano, KJ et al., 2005; Kloting, N et al., 2005). Los experimentos en ratas que recuperaron la sensibilidad a insulina tras la extracción quirúrgica de la grasa visceral confirman la relación entre el acúmulo de tejido adiposo en determinadas zonas y el desarrollo de la resistencia a insulina. (Gabriely, I et al., 2002). Además, la mejora de la sensibilidad a insulina tras la RC también ha sido relacionada con el aumento de la función y la densidad mitocondrial (Hunt, ND et al., 2006; Guarente, L, 2008)

Nuestro grupo de investigación ha empleado un protocolo de RC moderada aplicada en dos edades diferentes para desligar el incremento de la adiposidad asociada al envejecimiento de los efectos propios de la edad en el desarrollo de la resistencia a insulina en el rata Wistar. El descenso del nivel de adiposidad mediante RC produce una mejora de la sensibilidad global a insulina cuando la RC se aplica a una edad intermedia (Escrivá, F et al., 2007) y es acompañada de la recuperación de la sensibilidad a insulina en el hipotálamo (García-San Frutos, M et al., 2007). Sin embargo, cuando la RC se aplica a una edad avanzada no se observan mejoras en la sensibilidad a insulina ni se revierte la resistencia periférica la misma (Serrano, R et al., 2009), aunque sí se recupera la sensibilidad central a leptina que está disminuida en las ratas de 24 meses de edad (Fernández-Galaz, C et al., 2002). Estos resultados sugieren que las alteraciones metabólicas descritas en los tejidos periféricos se vuelven irreversibles a una edad avanzada, mientras que pueden revertirse mediante la disminución del nivel de adiposidad siempre que sea en una edad intermedia (Carrascosa, JM et al. 2011). En conjunto, estos datos confirman que el desarrollo de resistencia a insulina durante el envejecimiento en la rata Wistar es causado principalmente por el aumento de la adiposidad asociada al envejecimiento. Sin embargo, aun desconocemos cual es el papel del músculo esquelético en el desarrollo de la resistencia a insulina en la rata Wistar.

Objetivos

El rápido desarrollo a nivel mundial de la obesidad y la diabetes tipo II durante la última década, por encima de las previsiones de la OMS, ha demostrado la necesidad de investigar sus causas, y entre ellas los mecanismos implicados en el desarrollo de la resistencia a insulina, la cual es causa subyacente de ambas patologías. Está ampliamente demostrado que la resistencia a insulina está asociada al envejecimiento en humanos y en algunos modelos experimentales. Nuestro grupo ha usado desde hace tiempo la rata Wistar como modelo experimental para investigar el desarrollo de la resistencia a insulina con la edad. Los trabajos publicados por nuestro grupo y colaboradores sugieren que la resistencia a insulina está relacionada con los cambios corporales asociados al envejecimiento, siendo el principal de ellos el aumento de adiposidad visceral. En la actualidad sabemos que la rata Wistar desarrolla resistencia global y periférica a insulina, acompañada de una resistencia central a insulina y leptina y altos niveles circulantes de leptina a edad avanzada. Los resultados obtenidos han demostrado que el tejido adiposo juega un papel clave en el desarrollo de resistencia a insulina, siendo el primer tejido donde se observa. La alteración de su control metabólico, así como el incremento de la adiposidad visceral, provoca un exceso de secreción de AG y adipokinas, principalmente leptina, que pueden afectar al resto de tejidos periféricos. Sin embargo, aun está por clarificar el papel del músculo esquelético en este modelo. Este tejido tiene gran importancia en la regulación de la homeostasis de glucosa ya que es el tejido periférico que más glucosa puede capturar en respuesta a la acción de insulina.

Nuestra hipótesis postula que el aumento de la adiposidad visceral asociada a la edad induce alteraciones en los tejidos sensibles a insulina, el músculo esquelético entre ellos, que causan el desarrollo de la resistencia a la hormona a largo plazo. Nuestros datos permiten postular que la leptina puede desempeñar un papel relevante en el desarrollo de la resistencia a insulina.

Para comprobar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudio de la acción de insulina en el músculo esquelético de la rata Wistar durante el envejecimiento.
2. Análisis del efecto de la leptina actuando directamente sobre el músculo esquelético y el posible efecto de la edad sobre él.
3. Análisis del efecto de altas concentraciones de leptina, actuando directamente en el músculo esquelético, sobre la sensibilidad a insulina del mismo.

Los estudios mencionados se llevaron a cabo utilizando ratas Wistar de 3, 8 y 24 meses de edad alimentadas *ad libitum*. Para separar el efecto del incremento de adiposidad asociada a la edad de los efectos del envejecimiento *per se*, utilizamos un protocolo de restricción calórica moderada durante tres meses en los grupos de ratas de 8 y 24 meses de edad.

Materiales y Métodos

1. Modelo experimental.

a) Modelo de envejecimiento.

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho, procedentes de la colonia de envejecimiento del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Para los estudios de envejecimiento se usaron ratas maduras de 3 meses de edad (controles de edad), ratas de 8 meses (edad intermedia) y de 24 meses (edad avanzada) todas ellas alimentadas *ad libitum* (AL) con una dieta estándar para roedores (Harlam, #2014S. 14.5% proteína y 4% grasa). Los animales se estabularon en celdas aclimatadas con una temperatura de 22 °C y una humedad del 55 % constante, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. La manipulación de los animales fue llevada a cabo por personal formado y de acuerdo con las normativas de la Unión Europea. Los protocolos experimentales de este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid.

b) Modelo de restricción calórica (RC).

Ratas macho de 5 y 21 meses de edad fueron estabuladas en jaulas individuales y sometidas a un protocolo de RC moderado durante 3 meses. Las ratas fueron alimentadas con el 80% de la cantidad diaria de comida ingerida habitualmente, consiguiendo una reducción el peso corporal del 15-20% tras los 3 meses de restricción. Este protocolo de restricción no causa desnutrición ni afecta al desarrollo normal de los animales.

2. Caracterización del modelo experimental.

Los animales se utilizaron tras ayuno nocturno de 12-16 horas (excepto para la determinación de peso y la ingesta) y bajo anestesia cuando el procedimiento así lo requería.

a) Extracción de sangre y determinación de niveles de parámetros bioquímicos.

Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena de la cola de ratas en ayuno nocturno y se dejaron coagular 20 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugar 10 min a 700 g a temperatura ambiente para recoger el suero, que fue guardado a -70 °C hasta su uso. Los niveles de glucosa se midieron en el momento de la extracción de la sangre mediante el analizador de glucosa AccuTrend Plus (Roche Diagnostics, SL). Los niveles de insulina y leptina fueron analizados en suero mediante ELISA (Rat/Mouse Insulin ELISA kit y Rat Leptin ELISA kit; Millipore, #ERZMI-13K y #EZRL-83K, respectivamente). Los niveles de TAG en suero fueron analizados mediante la reacción de la glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa por espectrofotometría mediante un kit comercial (Biosystems, S.A. #COD11828). Los niveles de ácidos grasos libres en suero fueron analizados mediante el test colorimétrico utilizando el kit NEFA-HR(2) (Wako Chemicals GMBH, #436-91995).

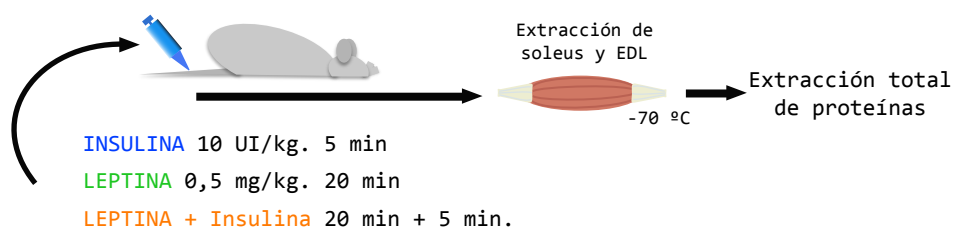
b) Test de tolerancia a insulina.

Ratas de los diferentes grupos experimentales se ayunaron entre 2 y 4 horas. Antes del inicio del test se extrajo una muestra de sangre de la vena de la cola (tiempo 0). Posteriormente se inyectó intraperitonealmente (ip) una dosis de insulina humana (NovoNordisk, # ActRapid HM) de 0,5 UI/kg. Tras 10, 20, 30, 45 y 60 minutos se extrajo una muestra de sangre de la vena de la cola y se determinó el nivel de glucosa. Los datos de glucemia se expresaron en porcentaje respecto al valor a tiempo 0 y se calculó el área debajo de la curva.

3. Protocolos experimentales.

a) Tratamientos *in vivo* mediante inyección intravenosa (iv).

Ratas de los diferentes grupos experimentales en ayuno nocturno fueron anestesiadas con tiopental sódico (Tiobarbital Braun, 40 mg/kg ip). Una vez alcanzado el grado de anestesia profunda y comprobada la pérdida de reflejos se procedió al tratamiento mediante la inyección iv a través de la vena de la cola y/o de la vena femoral con los siguientes estímulos: 1) suero salino; 2) insulina humana con una dosis de 10 UI/kg; y 3) leptina recombinante de rata (Sigma, # L-5037) a una dosis de 0,5 mg/kg. En el caso del tratamiento secuencial con leptina e insulina, se usó la vena femoral de cada pata trasera para cada estímulo, a las dosis indicadas (Ver Esquema MM1). Tras la inyección iv se esperó el tiempo de actuación propio de cada estímulo antes de sacrificar al animal mediante guillotina y proceder a la extracción secuencial del músculo EDL y el músculo soleus lo mas rápido posible. Los tiempos de estimulación fueron: 5, 10 y 20 minutos para insulina y suero salino y 20 minutos para leptina. En el caso del pretratamiento con leptina, transcurridos los 20 minutos de acción de la leptina se inyectó la insulina y se dejó actuar 5 minutos. Los músculos se lavaron en PBS 1X frío, se congelaron enteros en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta su posterior uso.



Esquema MM 1. Protocolo experimental para el análisis de la acción *in vivo* de insulina y leptina sobre el músculo esquelético de la rata Wistar.

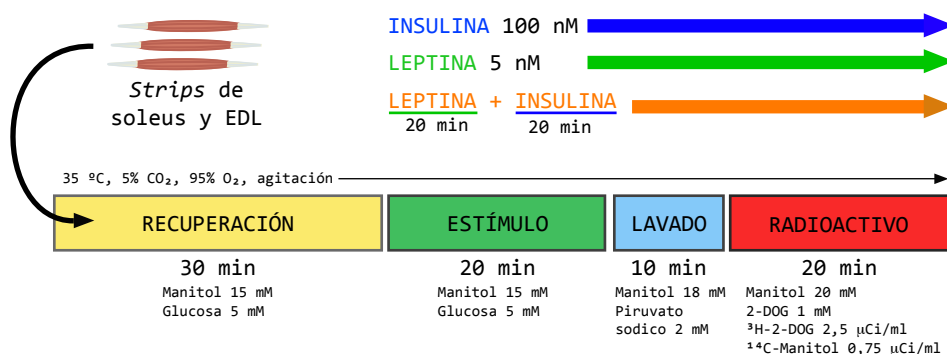
Los estímulos descritos se inyectaron por la vena de la cola y tras su tiempo de estimulación, se extrajeron los músculos para analizar la señalización intracelular producida por la acción de las hormonas.

b) Tratamientos *ex vivo*: Aislamiento de *strips* de músculo y medida de la incorporación de 2-DOG.

Ratas de todos los grupos experimentales, en ayuno nocturno, fueron anestesiadas con tiopental sódico. Tras alcanzar un estado de anestesia profunda, se procedió a la extracción directa del EDL y soleus de ambas patas traseras. Durante la extracción se evitó estirar excesivamente los músculos para minimizar el transporte de glucosa inducido por contracción. Los músculos, tras limpiarlos de sangre y restos de otros tejidos, fueron cortados longitudinalmente con cuidado de no romper las fibras musculares en *strips* de 30-50 mg de peso. Tras finalizar la extracción de músculos se sacrificó al animal mediante guillotina.

La medida del transporte de glucosa se realizó adaptando el método descrito anteriormente (Suarez, E et al., 2001). Brevemente, los *strips* de músculo fueron incubados secuencialmente en diferentes medios, usando como base un tampón Krebs-Henseleit con BSA libre de ácidos grasos 0,1% (ver lista de tampones) con una concentración final de azúcares de 20 mM, en agitación constante a 35 °C y gaseados de forma continua con carbógeno (5% CO₂, 95% O₂).

La diferente composición y el tiempo de incubación en cada medio está recogido en el esquema MM2. Tras 20 minutos en el medio con radioisótopos (medio Radioactivo), los *strips* se extraen del medio, se secan y se congelan en nitrógeno líquido. Sin descongelarse, se pesan los *strips* y se disuelven en NaOH 0,5 M para finalmente medir la incorporación de ³H-2-DOG y ¹⁴C-manitol en un contador de centelleo (LKB Wallac, 1219 Rackbeta con Ultraterm 2 software).



Esquema MM 2. Protocolo experimental para la determinación del transporte de glucosa en músculo esquelético aislado de la rata Wistar.

Músculos sin estimular, cortados longitudinalmente en *strips*, se incubaron secuencialmente en los medios indicados. Los estímulos se mantienen presentes desde el medio de Estímulo hasta el medio Radioactivo. Tras la incubación se calculó el transporte de glucosa mediante la determinación la incorporación de ³H-2-DOG, corregida por la cantidad de ¹⁴C-Manitol incorporado.

c) Tratamiento central con leptina: Implantación intracerebroventricular de mini bombas osmóticas.

Bombas osmóticas (Alzet, USA # Modelo 2001), unidas al inyector cerebral (Alzet, USA. # 0004760) fueron implantadas en el 3^{er} ventrículo cerebral (Coordenadas: 0,8 mm anterior, 1,6 mm lateral derecho, respecto a la bregma y 3,5 mm de profundidad, respecto de la superficie del cráneo, según Paxinos & Watson (Academic Press 1998). Las bombas fueron rellenas con aproximadamente 200 μ l de los tratamientos, que fueron: 1) suero salino, 2) leptina 0,0083 ng/ μ l (dosis 0,2 μ g/día); y 3) leptina 0,415 ng/ μ l (dosis 10 μ g/día) y unidas al inyector cerebral a una distancia de unos 3 cm de longitud. Previamente se pego en la base del inyector una arandela de plástico (grosor 0,5 mm, suministrada por el proveedor) para ajustar la profundidad. Las bombas fueron *activadas* mediante su incubación en suero salino durante 20 horas a 37 °C antes de su implantación. Para ello, ratas de los diferentes grupos experimentales en ayuno nocturno fueron anestesiadas con una mezcla de oxígeno, dióxido de nitrógeno e isoflurano y dispuestas en un estereotáxico (Kopf). Se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm de longitud en la piel del cráneo y se localizó la bregma para calcular la coordenadas. Una vez localizado el punto de inserción, se realizó una perforación del cráneo con un taladro dental. Tras la colocación del inyector en el agujero practicado, éste se fija al cráneo con cemento dental (3M Espe, # 56906) y la bomba osmótica se colocó en un *bolsillo* subcutáneo a la altura de los omoplatos. La incisión se cerró mediante grapas quirúrgicas (Alzet, USA Autoclips).

4. Determinación histoquímica de lípidos en el músculo.

Ratas de todos los grupos experimentales tras ayuno nocturno y sin ningún tratamiento fueron anestesiadas con pentotal sódico. Una vez alcanzado el estado de profunda anestesia, se extrajeron con cuidado los músculos EDL y soleus y se limpiaron de restos de sangre y otros tejidos. Los músculos enteros se fijaron en paraformaldehído 4% en tampón fosfato durante 24 horas y posteriormente se incubaron 48 horas en sacarosa 30%. Los extremos de los músculos se cortaron con un bisturí y el fragmento central se recubrió con TissueTek (Sakura) y se montó en un criostato (Reichert-Jung. 2800 Frigocut) a -18 °C. Cortes transversales de la sección media de cada músculo de 8-12 μ m de grosor fueron colocados sobre portaobjetos recubiertos con polilisina (Termo Scientific. # 2010-10). Los portaobjetos fueron teñidos primero al 0,5 % (p/v) Oil red O en isopropanol 36%, lavados con agua destilada y teñido de nuevo, esta vez con Oil red O en isopropanol 60%. Las muestras se lavaron en agua destilada durante 5 minutos y se montaron usando PBS 10% glicerol como medio de montaje. Las soluciones de Oil Red O en isopropanol se filtraron con filtros de 0,45 μ m antes de su uso.

Las fotografías fueron tomadas mediante una cámara CDD acoplada a un microscopio vertical (Zeiss, Axiokop 2 plus). La cuantificación de la tinción se realizó mediante el programa Image ProPlus 4.5 (MediaCybernetics), que calculó el número de píxeles de cada fotografía que superan un umbral de intensidad definido en muestras no teñidas y que cumplen los requisitos de 80% de forma esférica y tamaño entre 10-100 píxeles.

5. Análisis de la expresión de mRNA en músculo.

a) Extracción de RNA y síntesis del cDNA.

Muestras de músculos soleus y EDL procedentes de ratas no tratadas fueron troceadas en fragmentos de 20-30 mg, manteniéndolas congeladas con nieve carbónica. La extracción de mRNA se realizó mediante el kit RNAeasy fibrous tissue mini (Quiagen, # 74704), siguiendo las instrucciones del proveedor. La integridad del mRNA se comprobó mediante un gel de agarosa en tampón MOPS 1X (ver lista de tampones) y su concentración se cuantificó por espectrofotometría (Thermo Scientific, Nanodrop 1000). La síntesis del cDNA se realizó a partir de 1 µg de mRNA usando 20 unidades de transcriptasa AMV, 20 unds de RNAsin inhibitor, 10 mM d(NTP)s y 500 ng de Oligo Random Primer (todos los reactivos de Promega) en una reacción a 42 °C durante 1,5 horas.

b) Análisis de los cDNA mediante *realtime*-PCR.

La expresión relativa de los cDNA se analizó usando un AbiPrism 7900 HT (Roche) en placas de 384 pocillos mediante la tecnología SybrGreen. Cada muestra se analizó por triplicado, a partir de 5 ng de cDNA, 250 nM de cada *primer* (ver tabla de *primers*) y Power SybrGreen PCR Master Mix, en un volumen final de 10 µl por pocillo. Los resultados en Ct fueron analizados mediante el método descrito por Pfaffl (Pfaffl, MW, 2001), usando la expresión del RNA ribosómico 18S como gen normalizador. Como calibrador de cada gen se usó la media de la expresión de las muestras de 3 meses de edad.

El diseño de los primers se realizó mediante el software de la Web Universal Probe Library de Roche (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>) y a partir de las bases de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las secuencias de los primers de las dos isoformas del receptor de leptina (Ob-Ra y Ob-Rb) fueron facilitados por la Dra. Carmen Arribas (Universidad Castilla-La Mancha)

6. Análisis de la señalización intracelular en músculo esquelético.

a) Obtención de extractos totales de músculo.

Los músculos extraídos en los experimentos *in vivo* y guardados a -70 °C fueron pesados y homogenizados en tampón de lisis (ver lista de tapones) a razón de 1 ml/100 mg de tejido. Previamente se disolvió en el tampón de lisis 1 pastilla PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche # 11873580001) y 1 pastilla Complete Protease Inhibitor cocktail (Roche # 4693132001) por cada 20 ml de tampón de lisis. La homogenización mecánica se realizó con un polytron (Kinematica, #Polytron PT1200 C) en 4 ciclos de 10 s de homogenización seguidos de 15 s de reposo en hielo. Los fragmentos de tendones fueron retirados. Los homogenizados fueron incubados durante 1 h a 4 °C con rotación antes de ser centrifugados a 100.000 g durante 1 hora (Beckman Coluter, Ultracentrifuge Optima L-100 XP, rotor 70Ti).

La fracción soluble fue recogida evitando la fracción lipídica y congeló a -70 °C hasta nuevo uso. Un apequeña alícuota se guardó para la cuantificación de la cantidad de proteínas. Esta cuantificación se realizó mediante colorimetría usando el reactivo de Bradford (Bio-Rad # 500-0203) y determinando la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (BMG Labtech, FLUOStar OPTIMA).

b) Inmunodetección de proteínas.

Para la visualización de proteínas específicas se utilizó la técnica del *western-blot*. Para ello se separaron 30 µg de proteína de los extractos totales diluidas con tampón Laemmli 4x (ver lista de tampones) en geles de SDS-PAGE a 120 V. El porcentaje de acrilamida:bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad, #161-0146) de los geles varió desde el 6% (separación de IRβ e IRS-1) hasta el 12% (separación de SOCS-3 y p38). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman, # BA83) durante 1 hora a 100 V. Las membranas fueron bloqueadas con PhosphoBlocker 3% (Cell Biolabs, #AKR-103) en TBS-T 0,1% (ver lista de tampones) antes de ser incubadas con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C con agitación (ver tabla de anticuerpos). Tras lavar las membranas con TBS-T 0,1% se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa (dilución 1:5.000 – 1:10.000) y se reveló mediante reactivos comerciales de ECL (Perkin Elmer, #NEL102001EA). Los anticuerpos se diluyeron a las concentraciones indicadas en la tabla de anticuerpos en 1% PhosphoBlocker en TBS-T 0,1%. Las autoradiografías se densitometraron (Bio-Rad. GS800 calibrated densitometer) y cuantificaron mediante el cálculo de las diferencias del volumen de la intensidad de cada banda manteniendo el mismo área de análisis (Bio-Rad. Quantity One software). La expresión de GAPDH se empleó como control de carga de los experimentos de *western-blot*. Cuando se necesitó ensayar mas de un anticuerpo sobre la misma membrana, se uso un tampón de *stripping* (ver lista de tampones) durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de volver a incubar con un nuevo anticuerpo primario durante la noche.

c) Análisis de la fosforilación de IRβ e IRS-1.

100 µl de proteína A agarosa fueron incubados durante 2 horas a 4 °C con 2 mg de anticuerpo anti-pTyr en tampón de lisis. Tras lavar los conjugados 2 veces con tampón de lisis, se incubaron con 1 mg de muestra durante 12 horas a 4 °C con rotación. Tras lavar 3 veces con tampón de lisis, se centrifugo 1 min y se retiro el sobrenadante. Los complejos resultantes de la inmunoprecipitación fueron diluidos en 30 µl de tampón Laemmli 2x y hervidos durante 5 min. Tras centrifugar 1 min, 30 µl del sobrenadante se resolvieron en geles SDS-PAGE al 6% y se incubaron con anticuerpos específicos contra IRS-1 y IRβ según el protocolo antes descrito.

7. Análisis estadístico de los resultados.

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software) y la función de análisis de datos del software Excell 2004 (Microsoft). Las comparaciones de los datos de los 3 grupos de envejecimiento (3, 8 y 24 meses AL). Se realizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de 1 o 2 vías en función del experimento, seguido de un test post-hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. La comparación entre los resultados de los grupos AL y RC de la misma edad se realizó mediante el test de la t de Student, pareado o no pareado en función del experimento. En el caso de comparaciones de tratamientos en grupos de RC se usó un análisis ANOVA de 1 o 2 vías entre los grupos AL y RC de la misma edad. Se consideró que existen diferencias significativas con $p < 0,05$.

8. Anexo de Materiales y Métodos.

a. Tabla de anticuerpos.

Anticuerpo primario	Casa Comercial	Dilución empleada	Anticuerpo secundario
IR β (monoclonal)	Cell Signaling #3025	1:500	GARPO
IRS-1	Cell Signaling #2382	1:1000	GARPO
Phospho Akt Ser ⁴⁷³ (monoclonal)	Cell signaling #4051	1:2000	HAMPO
Akt	Cell Signaling #9272	1:2000	GARPO
Phospho AMPK α Thr ¹⁷²	Cell Signaling #2531	1:500	GARPO
AMPK α	Cell Signaling #2532	1:2000	GARPO
pTyr (clon 4G10) (monoclonal)	Millipore #05-321	IP: 2 mg/ml	--
SOCS-3	Cell Signaling #2923	1:500	GARPO
Phospho STAT3 Tyr ⁷⁰⁵	Cell Signaling #9131	1:500	GARPO
STAT3 (monoclonal)	BD Transduction Lab #610189	1:1000	HAMPO
GAPDH (14C10)	Cell Signaling #2118	1:10.000	GARPO
Phospho p38MAPK Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸² (monoclonal)	Cell Signaling #9216	1:1000	HAMPO
p38MAPK	Cell Signaling #9212	1:2000	GARPO

b. Tabla de secuencias de los *primers*.

GEN	PRIMERS	Longitud (nt)
rRNA 18S	5'-AATCAGTTATGGTTCCTTTGTCG-3'	23
	3'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA-5'	26
FATP	5'-GGGTTTGCAAGCCAGAGA-3'	18
	3'-CAAAGCAGCCCCAATGAG-5'	18
CD36	5'-TGAGAAGTCTCGAACACTGAGG-3'	22
	3'-TCCAAACACAGCATAGATGGAC-5'	22
DAGT-1	5'-AAGGGTCAAGGCCAAAGC-3'	18
	3'-GGTTGTCCGGATAGCTTACAGT-5'	22
ACCb	5'-GGAGGCCTCACCCAACTC-3'	18
	3'-AACTGCCATGGTCGAAGAAT-5'	20
HSL	5'-CGAGCACTGGAGGAGTGTTT-3'	20
	3'-TATCCGCTCTCCGGTTGA-5'	18
MCD	5'-ACCCCCTGGTTGTTCTGC-3'	18
	3'-GGGCACTCTTTCACAATGCT-5'	20
CPT-1b	5'-CTCCTTTCCTGGACGAGGT-3'	19
	3'-GATCTGGAAGTGGGGGATCT-5'	20
Ob-Ra	5'-GAGAACGGACACTCTTTGAAGTC-3'	23
	3'-AGTCATTCAAACCATAGTTTAGG-5'	23
Ob-Rb	5'-GCATGCAGAATCACTGATATTTGG-3'	24
	3'-TGTATAGCCCCTTGCTCTTCA-5'	21
STAT3	5'-CCTTGGATTGAGAGCCAAGAT-3'	21
	3'-ACCAGAGTGGCGTGTGACT-5'	19
SOCS-3	5'-AAGATCCCGCTGGTACTGAG-3'	20
	3'-CAAAGATGCTGGAGGGTAGC-5'	20
AMPK α 1	5'-CCGGAGGTCATCTCAGGA-3'	18
	3'-AGGGCATAACAGGATAACACCA-5'	21
AMPK α 2	5'-CCGTCTGATATTTTCATGGTCA-3'	22
	3'-GACTCTCCTTTTCGTCCAACC-5'	21

C. Listado de tampones.

1. Tampón Krebs-Henselit.

Stock I: NaCl 118.5 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, NaHCO_3 25 mM.

Stock II: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, HEPES 5 mM.

2. Medios de incubación: Usar como base tampón Krebs-Henselit, 0.1% BSA.

Medio Recuperación: manitol 15mM, glucosa 5 mM

Medio Estímulo: manitol 15 mM, glucosa 5 mM

Medio Lavado: manitol 18 mM, piruvato sódico 2 mM

Medio Radioactivo: manitol 20 mM, 2-DOG 1 mM,
 ^3H -2-DOG 2.5 $\mu\text{Ci/ml}$, ^{14}C -manitol 0.7 $\mu\text{Ci/ml}$.

3. Tampón MOPS 10X

MOPS 200 mM pH 7.0, acetato sódico 80 mM, EDTA 10 mM pH 8.0.

4. Tampón carga RNA 10x

EDTA 0.5 mM pH 8.0, azul bromofenol 0.25%, glicerol 50%.

5. Gel agarosa 1.5% para RNA

1.5 g agarosa *low meelting*, MOPS 1x 10 ml, formaldehído 16.6 ml y H_2O hasta 100 ml

6. Tampón de lisis

HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, NAF 10 mM, EDTA 2mM pH 8.0, glicerol 10%, NP-40 1%. Ajustar a pH 7.4

7. Tampón TBS-T

Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Ajustar a pH 7.4. Añadir Tween-20 0.1%.

8. Tampón de stripping

Glicina 0.2 M, SDS 0.1%, NP-40 sustitute 1%. Ajustar a pH 2.2

9. Tampón de carga Laemmli 4x

Tris 200 mM pH 6.8, SDS 8%, azul bromofenol 40 mg, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 5%.

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE RATA WISTAR.

El modelo experimental de envejecimiento utilizado en este trabajo fue la rata Wistar. En la figura 1 podemos observar como la rata Wistar muestra un aumento progresivo y significativo del peso corporal durante el envejecimiento ($p < 0,001$). Este aumento de peso está provocado principalmente por un aumento del tejido adiposo, como indica el índice de adiposidad (Horrillo, D et al., 2011). Aunque la adiposidad aumente rápidamente a los 8 meses y posteriormente se mantenga estable hasta los 24 meses, el peso corporal sigue aumentando debido al incremento del tamaño corporal.

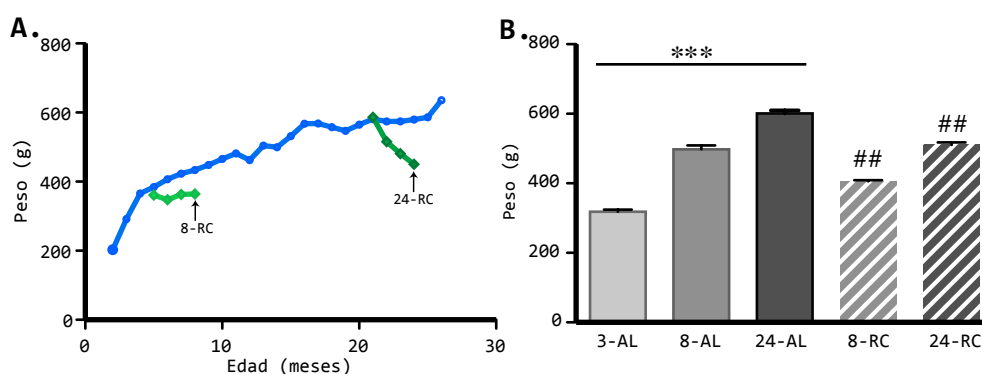


Figura 1. Caracterización del modelo experimental de rata Wistar.

A. Evolución del peso corporal con la edad en ratas alimentadas *ad libitum* (AL, línea azul) y aplicando un protocolo de restricción calórica moderada durante 3 meses (RC, líneas verdes). **B.** Pesos medios de los grupos experimentales. Los datos están expresados como media \pm SEM, con $n=10-15$ ratas por grupo. *** $p < 0,001$ entre los 3 grupos AL; y ## $p < 0,01$ entre los grupos AL y RC de la misma edad.

Este aumento de peso va acompañado de un leve aumento de los niveles de glucosa e insulina en condiciones de ayuno nocturno que en el caso de la glucosa alcanzan significatividad estadística a los 24 meses de edad, como se observa en el figura 2. Sin embargo, los niveles de insulina, a pesar de que muestren un leve incremento con la edad, no cambian significativamente a los 24 meses. El análisis de otros factores circulantes muestra que los niveles de leptina y TAG en sangre también aumentan durante el envejecimiento. Como podemos observar en la figura 2, existe un aumento progresivo de los niveles de leptina con la edad que alcanza significatividad en animales de 24 meses ($p < 0,01$). Este aumento parece ser consecuencia del aumento de adiposidad, que ya es significativo en ratas de 8 meses de edad. Estos datos confirman la presencia de resistencia central a la leptina en los animales viejos y el desarrollo de hiperleptinemia compensatoria (Fernández-Galaz, C et al., 2002). En cambio, los niveles de TAG muestran un aumento rápido a los 8 meses sin que haya un incremento posterior, lo que se correlaciona con el comportamiento del índice de adiposidad. Por el contrario, los niveles de AG en sangre no aumentan con la edad, observándose incluso un descenso significativo a edades avanzadas.

Algunos de los cambios desarrollados durante el envejecimiento pueden ser revertidos en parte mediante la aplicación de un protocolo de RC moderada durante 3 meses. En este trabajo se han utilizado dos grupos de RC: un grupo de RC temprana, que comprende desde los 5 hasta los 8 meses; y un grupo de RC tardía, que abarca desde los 21 a los 24 meses. En ambos grupos se obtiene una reducción del peso corporal del 19% y 15% para animales de 8 y 24 meses respectivamente, comparados con su grupo control AL como se aprecia en la figura 1. Esta intervención reduce a su vez los niveles de leptina, TAG y AG libres en ambos grupos, según se ilustra en la figura 2.

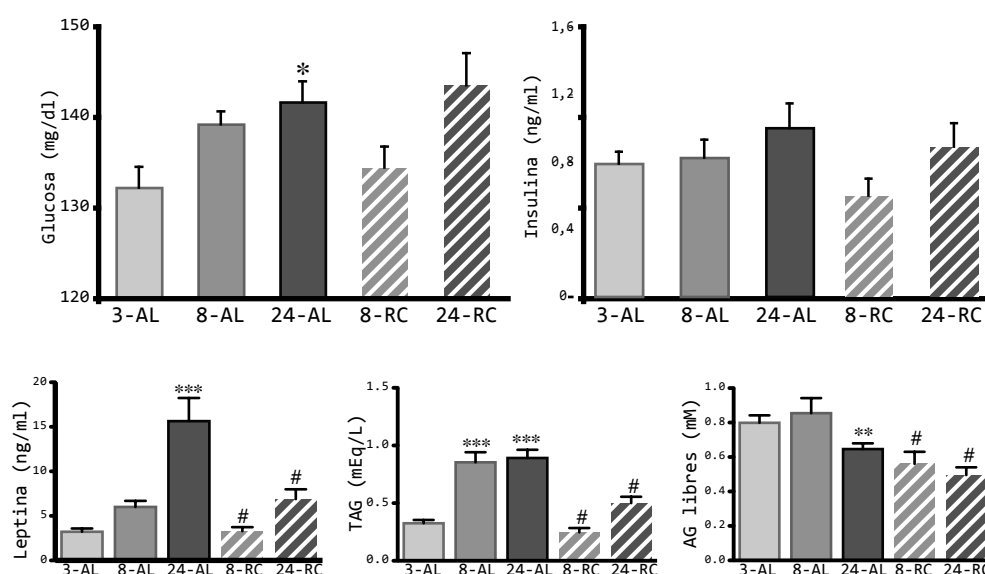


Figura 2. Medidas de los principales parámetros metabólicos presentes en suero.

La extracción de los sueros se realizó tras ayuno nocturno. El análisis de la varianza entre los grupos alimentados AL mostró la existencia de diferencias significativas asociada al envejecimiento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto al grupo control 3-AL. El análisis de los efectos de la RC indica las diferencias respecto al grupo AL de la misma edad; # $p < 0,05$. (t-student no pareada). $n=8-15$ ratas por grupo.

Numerosos trabajos en varios modelos de experimentación y en humanos relacionan el incremento de la adiposidad con la aparición de resistencia a insulina (Gabriely, I et al., 2002). Para estudiar si los cambios corporales asociados al envejecimiento modifican la sensibilidad general a insulina en la rata Wistar, analizamos la sensibilidad a insulina mediante un test de tolerancia a insulina. En la figura 3 podemos observar la variación de los niveles de glucosa durante 60 minutos tras la inyección ip de insulina (0,5 UI/kg). El grupo 24-AL presenta un aumento muy significativo del área bajo la curva ($p<0,01$) respecto al resto de grupos de edad. Esto indica que la sensibilidad a insulina está disminuida a edades avanzadas y que la rata Wistar desarrolla resistencia global a insulina con la edad. El análisis del efecto de la RC sobre la tolerancia a insulina muestra que a las dos edades estudiadas esta intervención es efectiva y produce un incremento de la sensibilidad a insulina. En las ratas de 8 meses de edad sometidas a RC, la sensibilidad a insulina es mayor incluso que en las ratas jóvenes (figura 3, $p<0,05$ al comparar 3-AL vs. 8-RC), mientras que en los animales de 24 meses de edad la RC restaura la sensibilidad a un nivel similar al de ratas maduras.

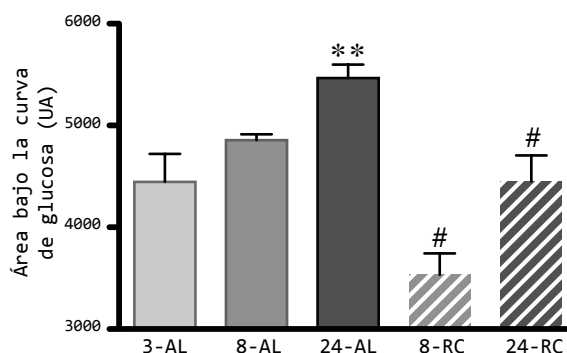


Figura 3. Cambios en la sensibilidad a insulina con la edad y la RC.

La sensibilidad a insulina se determinó mediante el test de tolerancia a insulina, midiendo los niveles de glucosa durante 60 minutos tras una inyección intraperitoneal (ip) de insulina (0,5 UI/kg). Las datos representan el área bajo la curva, expresado como la media \pm SEM en unidades arbitrarias, con $n=4-6$ ratas por cada grupo. ** $p<0,01$ respecto a 3-AL; y # $p<0,05$ respecto al grupo AL de la misma edad.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA WISTAR: EFECTO DE LA EDAD Y LA RC.

Dado que los músculos pueden presentar diferentes características metabólicas en función del tipo de fibras que los componen, usamos dos tipos musculares diferentes, que se caracterizan por poseer un contenido de fibras fundamentalmente homogéneo: el músculo soleus, compuesto principalmente por fibras de tipo I; y el *extensor digitorum longus* (EDL) como prototipo de un músculo de fibras de tipo IIa (Johnson, MA et al., 1973).

A. Análisis de la capacidad de almacenamiento de lípidos en el músculo esquelético de la rata Wistar.

Una de las principales diferencias entre ambos tipos de músculo radica en su metabolismo y en su mayor o menor capacidad de usar AG como fuente de energía. Considerando que hay un aumento del índice de adiposidad y TAG en sangre con la edad, estudiamos la capacidad de almacenamiento de lípidos en forma de gotas lipídicas dentro de estas fibras musculares mediante una tinción histológica con Oil Red O, colorante que tiñe los lípidos neutros. Como se observa en la figura 4, el músculo soleus acumula una mayor cantidad de lípidos que el EDL. A los 24 meses de edad, ambos músculos muestran un gran incremento de lípidos intramiocelulares. La RC provoca un descenso de los lípidos almacenados en el músculo soleus tanto a edades tempranas como tardías. Sin embargo, el músculo EDL no presenta diferencias significativas entre los grupos AL y RC. Este músculo, debido a su metabolismo más anaeróbico, no acumula grandes cantidades de lípidos. Sin embargo, como observa en la figura 4, el EDL en situaciones de alta adiposidad, puede llegar a acumular lípidos en el interior de las fibras musculares. Esto podría representar un mecanismo mediante el cual se intenta reducir el exceso de TAG y AG circulantes, usando otros tejidos menos especializados en la acumulación de lípidos. Estos resultados confirman que la capacidad de acumulación de lípidos intramiocelulares es dependiente del tipo de fibra muscular.

B. Análisis de la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico muscular.

En la figura 5 se muestran los patrones de expresión relativa de los mRNA de diferentes proteínas implicadas en el metabolismo lipídico. Los resultados se muestran referidos a la expresión observada en el grupo control (3-AL) y clasificados en dos grupos: enzimas lipogénicas y enzimas lipolíticas.

En términos generales, del análisis de los datos de expresión se puede inferir que:

i) El músculo soleus no muestra grandes variaciones con la edad y/o la RC en la expresión de las enzimas del metabolismo lipídico, mientras que el EDL presenta mayores variaciones con la edad;

ii) En ambos músculos la expresión de las enzimas lipogénicas tiende a aumentar con la edad, mientras que hay un descenso en la expresión de las enzimas lipolíticas;

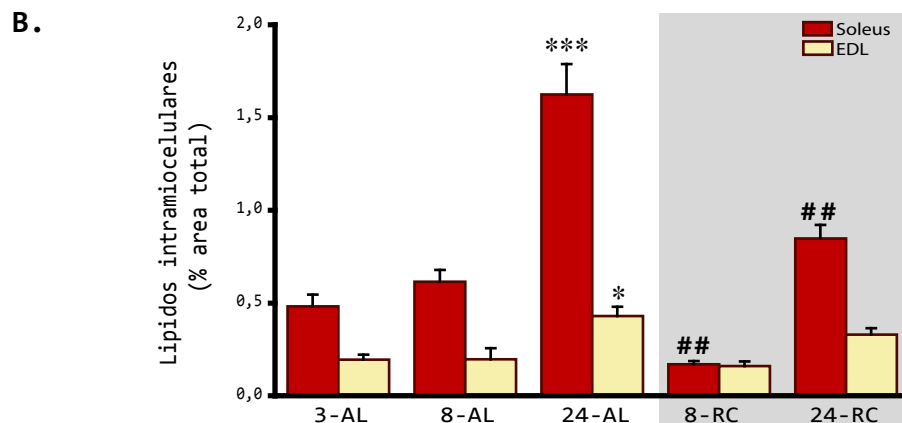
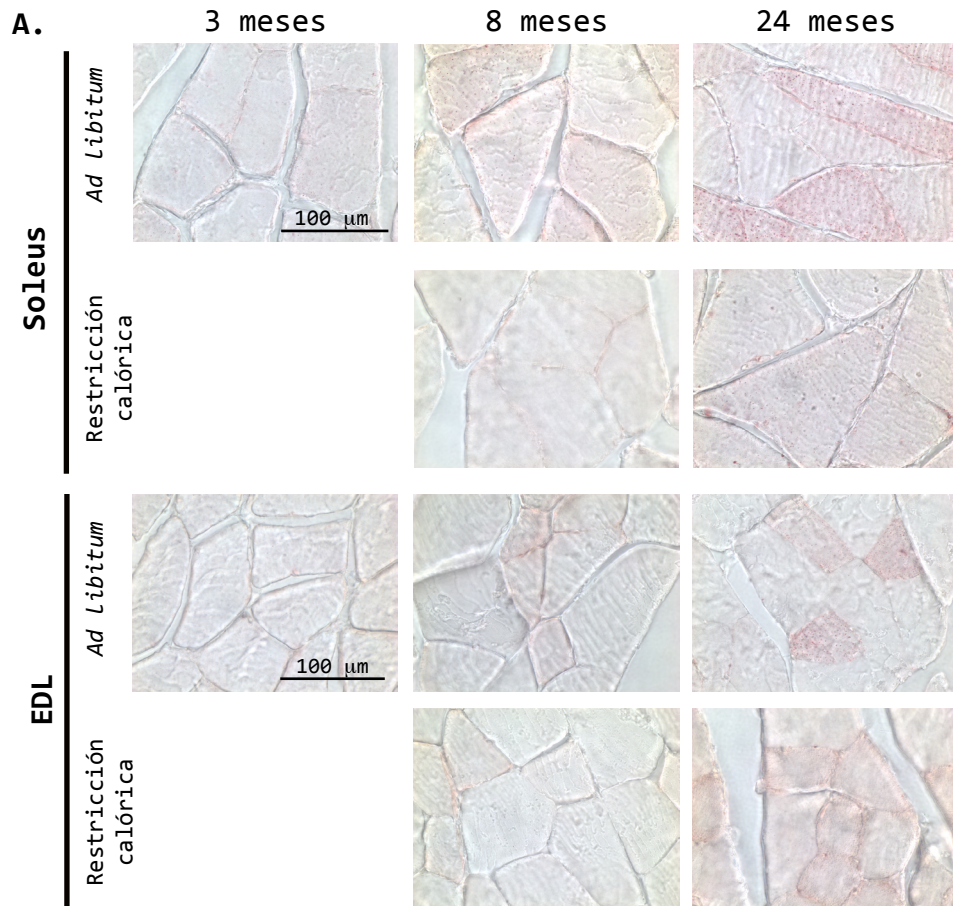


Figura 4. Efecto de la edad y la RC en el almacenamiento de lípidos intramiocelulares.

A. Fotografías representativas de lípidos intramiocelulares en cortes transversales de músculo soleus y EDL, tras tinción histológica con Oil red O. La barra indica una distancia de 100 μ m. **B.** Cuantificación de los lípidos intramiocelulares teñidos positivamente con Oil red O. Los resultados están expresados como la media \pm SEM del porcentaje del área total fotografiada, obtenida de 3-5 fotografías de cada rata, con n=4 ratas por grupo. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,0001$ respecto al grupo 3-AL de cada músculo; ## $p < 0,001$ entre los grupos RC y AL de la misma edad.

iii) La RC temprana tiende a reducir la expresión de la mayoría de las enzimas analizadas, afectando de forma mas significativa a las enzimas lipolíticas. La RC tardía provoca algunos cambios en soleus, donde parece inducir un ligero descenso de la expresión de la mayoría de la enzimas de ambos tipos. En conjunto, estos resultados parecen ser acordes al acúmulo de lípidos visto anteriormente y el aumento de TAG circulantes con la edad .

El análisis de la expresión de los transportadores de AG estudiados, FATP y CD36, refleja una mayor expresión con la edad. En soleus es el FATP el transportador que se expresa a un mayor nivel en animales de 24 meses, mientras que en EDL es el CD36 el transportador que se mantiene elevado en ratas de mayor edad. En cualquier caso, el acúmulo de lípidos intramiocelulares observados a edades avanzadas en ambos músculos parece estar mediado por una mayor disponibilidad de sistemas de transporte de AG.

Respecto a DAGT-1, enzima implicada en la formación de TAG, no se aprecian cambios significativos con la edad, ni en soleus ni en EDL, lo que sugiere que no desempeña un papel relevante en el acúmulo de lípidos asociado al envejecimiento.

La ACC, enzima implicada en la síntesis de malonil-CoA, solo experimenta un aumento importante en EDL en el grupo 24-AL. Esto sugiere que en este tipo muscular podría tener un papel favorecedor del almacenamiento de lípidos al incrementar el nivel de malonil-CoA, que provoca la inhibición de CPT-1B, lo que reduce la β -oxidación de AG. La disminución a los 24 meses de la expresión de la MCD, enzima responsable de la descarboxilación del malonil-CoA apoya la idea de la contribución del malonil-CoA a la inhibición de la oxidación mitocondrial de lípidos.

En lo que concierne a las enzimas lipolíticas los datos de la figura 5 indican que su expresión no experimenta variaciones relevantes con la edad en el soleus, mientras que en EDL la expresión de HSL y de MCD disminuye significativamente en animales viejos. Esto implica una menor degradación de TAG y de malonil-CoA. Dado que la síntesis de malonil-CoA por la ACC está incrementada, puede postularse que en animales viejos se producirá una mayor inhibición de la CPT-1B y consecuentemente del transporte de AG a la mitocondria para su oxidación.

La RC temprana induce en mayor medida un disminución de los sistemas de transporte de AG así como un descenso en soleus de DGAT-1, responsable de la esterificación del DAG. Paradójicamente, la expresión de HSL y de CPT-1B así como la de MCD se encuentran disminuidas en los dos tipos musculares, lo que podría contribuir a contrarrestar los cambios observados en los sistemas de transporte de AG. Respecto a la RC tardía, los datos de la figura 5 indican una ausencia de cambios significativos en EDL con la excepción de la disminución de ACC que se ve compensada por la menor expresión de CPT1B. Por el contrario, en soleus se observa una disminución en la expresión de las enzimas lipogénicas que no alcanza significatividad estadística, compensada también por la mayor expresión de las enzimas lipolíticas.

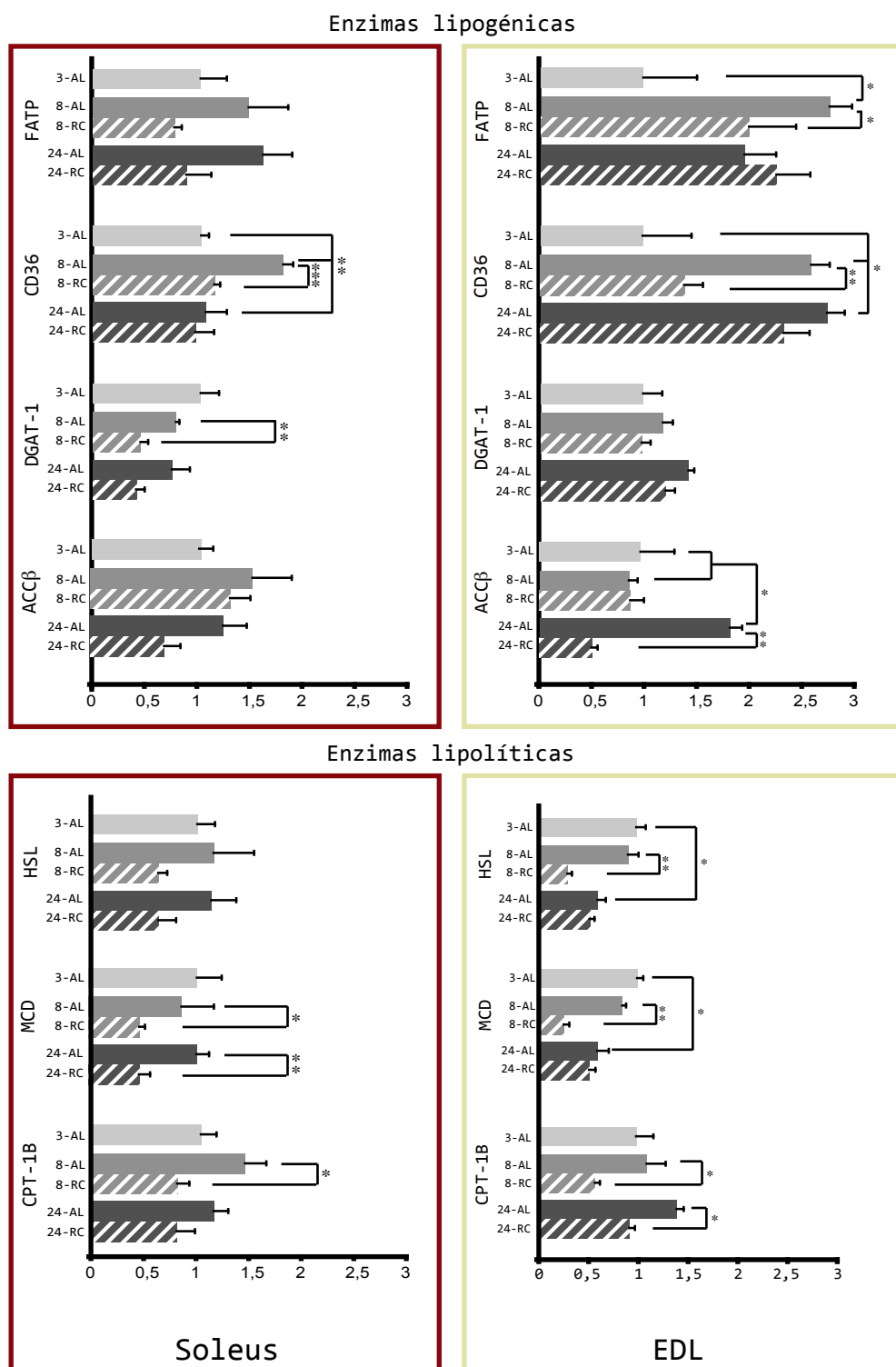


Figura 5. Análisis de la expresión relativa de los mRNA de las principales enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en el músculo esquelético: efecto de la edad y la RC.

La expresión de los mRNAs se cuantificó mediante la técnica *realtime* PCR (ver Materiales y Métodos) y se normalizó en función de la observada en el grupo control 3-AL. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de expresión de 3 experimentos independientes, con $n=4-6$ ratas por grupo. * $p<0,05$ y ** $p<0,001$ entre los grupos indicados.

C. Análisis de la expresión de proteínas de las vías de señalización de insulina y leptina en músculo esquelético.

En la figura 6 se muestran los niveles de expresión de las principales proteínas implicadas en la señalización de insulina y de leptina en el músculo de ratas Wistar. La expresión de estas proteínas con el envejecimiento y/o la RC no muestra cambios significativos, con la excepción de SOCS-3, cuya expresión está elevada en músculos de animales de 24 meses de edad y no muestra variación tras la RC tardía. Esto indica una posible reducción de la acción de leptina en el músculo esquelético a edad avanzada.

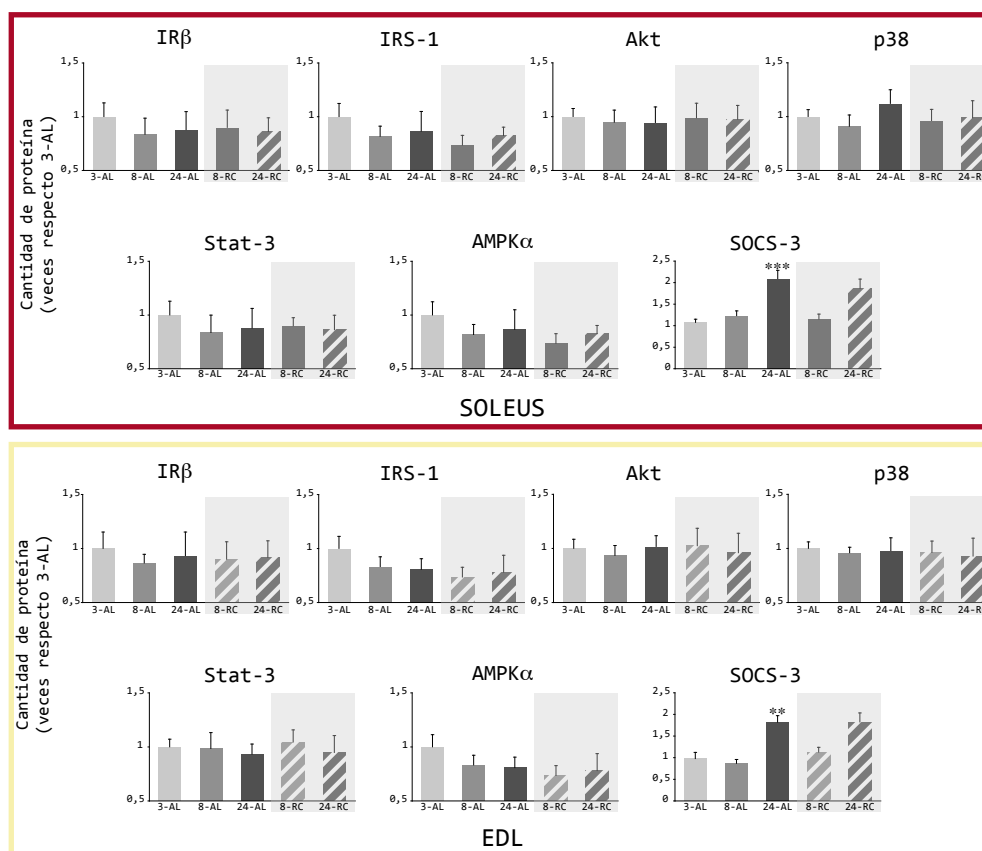


Figura 6. Análisis de la expresión de proteínas de las vías de señalización de insulina y leptina en el músculo esquelético.

La cantidad de proteína se corrigió por la cantidad de la proteína GAPDH expresada en el mismo individuo. Los datos están expresados como la media \pm SEM de las veces de expresión respecto a la media del grupo control 3-AL, obtenidas de 4 experimentos independientes con $n=5-7$ muestras por cada grupo. ** $p<0,001$ y *** $p<0,0001$ respecto 3-AL.

3. ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

A. Estudio de la acción aguda de insulina *in vivo* en el músculo esquelético.

Con el fin de estudiar si la acción de insulina sobre el músculo varía a diferentes tiempos, se analizó el efecto de una dosis suprafisiológica de insulina intravenosa (10 UI/kg) a los 5, 10 y 20 minutos tras la inyección iv de la hormona, sobre la estimulación de la señal celular en ratas de 3 meses de edad.

En la figura 7 se muestra la variación temporal de la acción de la insulina en los dos tipos de músculo analizados. Como puede observarse en ella, la insulina *in vivo* induce la fosforilación de IR β e IRS-1 en residuos de tirosina, así como la fosforilación de Akt en su residuo Ser⁴⁷³, mientras que en ausencia de estímulo no se detecta ninguna señal de fosforilación. La cuantificación de la respuesta temporal a la insulina indica que a los 5 minutos se obtiene la respuesta máxima tanto en soleus como en EDL. La comparación del efecto de insulina sobre ambos músculos demuestra que el soleus es más sensible y tiene una respuesta más persistente en el tiempo.

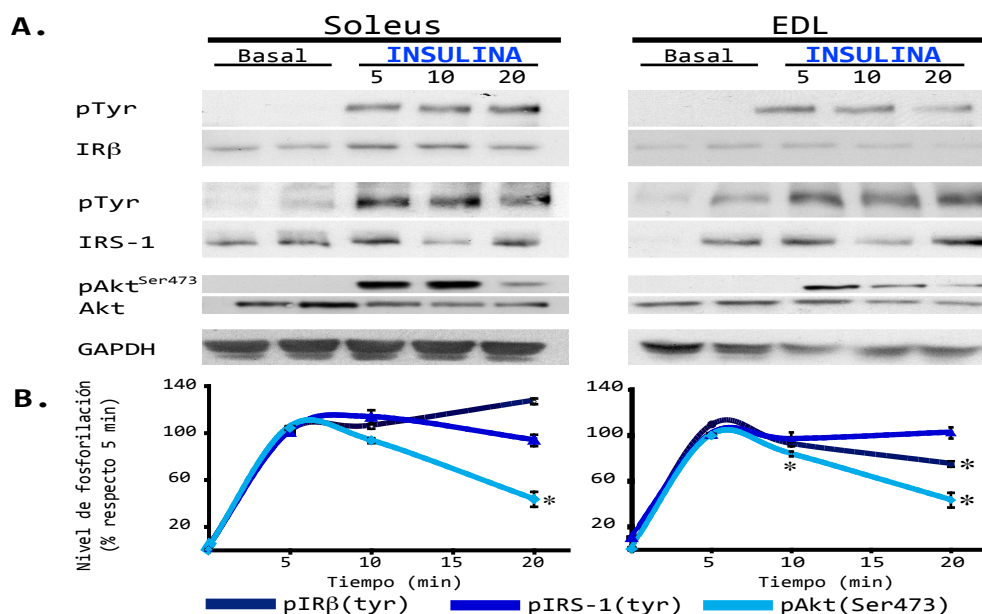


Figura 7. Variación con el tiempo de la acción de insulina *in vivo* sobre el músculo esquelético.

A. Blots representativos de la estimulación de la vía de señalización de insulina tras la inyección iv de insulina (10 UI/kg) a los tiempos indicados. La fosforilación de los residuos de tirosina de IR β e IRS-1 se determinó a partir de extractos totales inmunoprecipitados con anticuerpos anti-pTyr. Los blots de IR β , IRS-1 y Akt muestran la cantidad total de cada proteína. **B.** Cuantificación de la estimulación de la fosforilación de IR β , IRS-1 y Akt inducida por insulina *in vivo*. Los valores de fosforilación de cada proteína fueron corregidos por la cantidad total de la misma y posteriormente referidos al valor observado a los 5 min de estimulación, considerado como el 100%. Los datos se expresan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, con n= 3 ratas por cada condición. * p<0,05 respecto al valor en 5 min para la misma proteína

Los resultados en EDL muestran que a partir de los 10 minutos la acción de insulina sobre Akt desciende significativamente y que a los 20 minutos esta disminución afecta tanto a la fosforilación de Akt como a la de IRS-1. A raíz de estos resultados establecimos un tiempo de 5 minutos para estudiar el efecto de insulina en el resto de grupos de edad y dieta.

B. Acción de la insulina *in vivo*: Efecto de la edad y la RC en la señalización intracelular inducida por insulina en músculo.

Las figuras 8-10 muestran el efecto de la insulina *in vivo* a los 5 minutos sobre la fosforilación de IR β , IRS-1 y Akt en todos los grupos experimentales. Tanto en soleus como en EDL se observa una disminución con la edad de la fosforilación inducida por insulina en las tres proteínas implicadas en la acción de la hormona. En soleus dicha disminución es significativa en IR β y Akt a los 8 meses de edad, mientras que en EDL la acción de la hormona disminuye significativamente sólo en los animales de 24 meses.

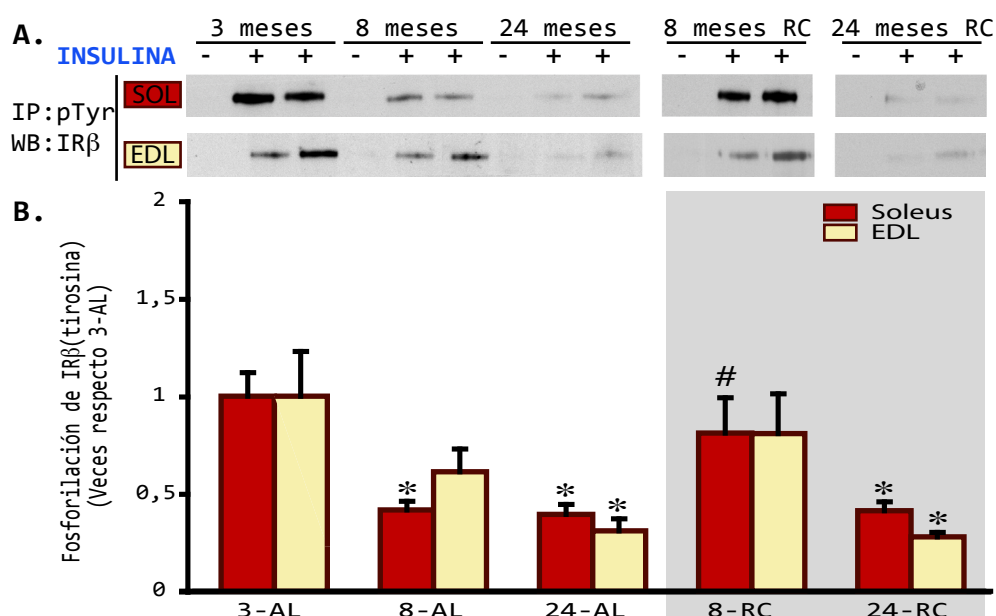


Figura 8. Acción de la insulina *in vivo*: efecto de la edad y la RC en la fosforilación en tirosina de IR β .

A. Blots representativos de la fosforilación de IR β inducida por insulina. Extractos totales de músculo obtenidos 5 min después de la inyección iv de insulina (10 UI/kg) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-pTyr. **B.** Cuantificación de la fosforilación de IR β referida al valor medio del grupo 3-AL. Los datos se expresan como media \pm SEM de las veces de estimulación, correspondientes a 4 experimentos independientes, con n=5-6 ratas por cada grupo. * p<0,05 respecto a 3-AL. # p<0,05 respecto al grupo AL de la misma edad.

El análisis del efecto de la RC muestra que tanto el soleus como el EDL experimentan cambios similares en el nivel de fosforilación de las tres proteínas. La RC sólo es efectiva en animales de 8 meses de edad, en los cuales el nivel de fosforilación de las tres proteínas está aumentado respecto a su grupo control, 8-AL. El soleus se muestra más sensible al efecto de la RC temprana que el EDL, mostrando aumentos mayores en los niveles de fosforilación de las tres proteínas. Este efecto de la recuperación de la sensibilidad a insulina provoca que los niveles de fosforilación de IRS-1 y Akt superen incluso al observado en ratas control de 3 meses de edad. Sin embargo, la RC tardía no produce ninguna variación de la fosforilación en respuesta a insulina en ninguna de las tres proteínas analizadas respecto a su grupo control 8-AL.

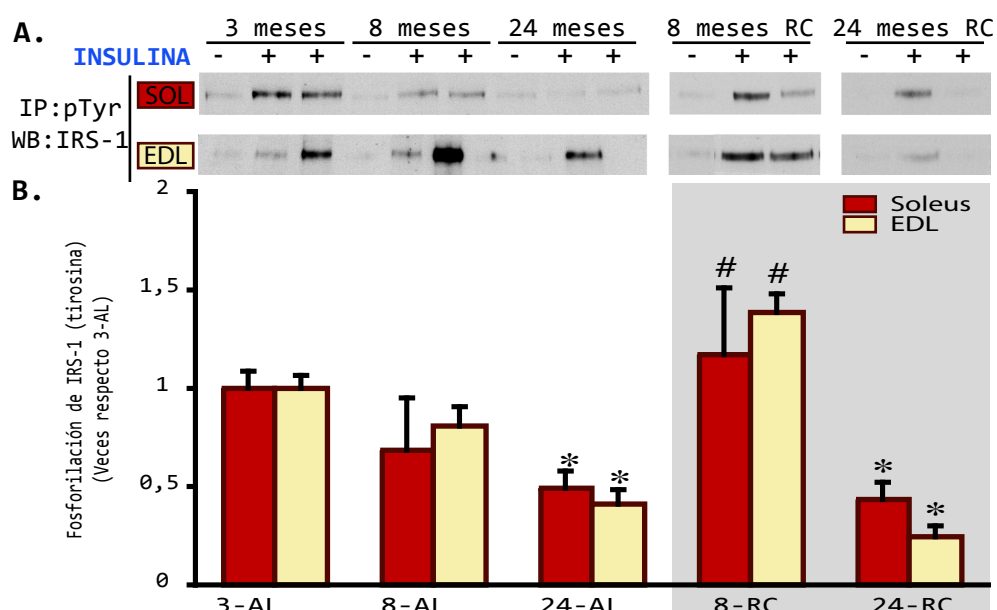


Figura 9. Acción de la insulina *in vivo*: efecto de la edad y la RC en la fosforilación en tirosina de IRS-1.

A. Blots representativos de la fosforilación inducida por insulina de IRS-1. La imagen muestra la cantidad de IRS-1 tras la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-pTyr de extractos totales de músculo obtenidos 5 min después de la inyección iv de insulina (10 UI/kg). **B.** Cuantificación de la fosforilación de IRS-1 referida al valor medio del grupo 3-AL. Los datos se expresan como la media \pm SEM de las veces de estimulación, correspondientes a 4-5 experimentos independientes, con n=5-6 ratas por cada grupo. * $p < 0,05$ respecto a 3-AL. # $p < 0,05$ respecto al grupo AL de la misma edad.

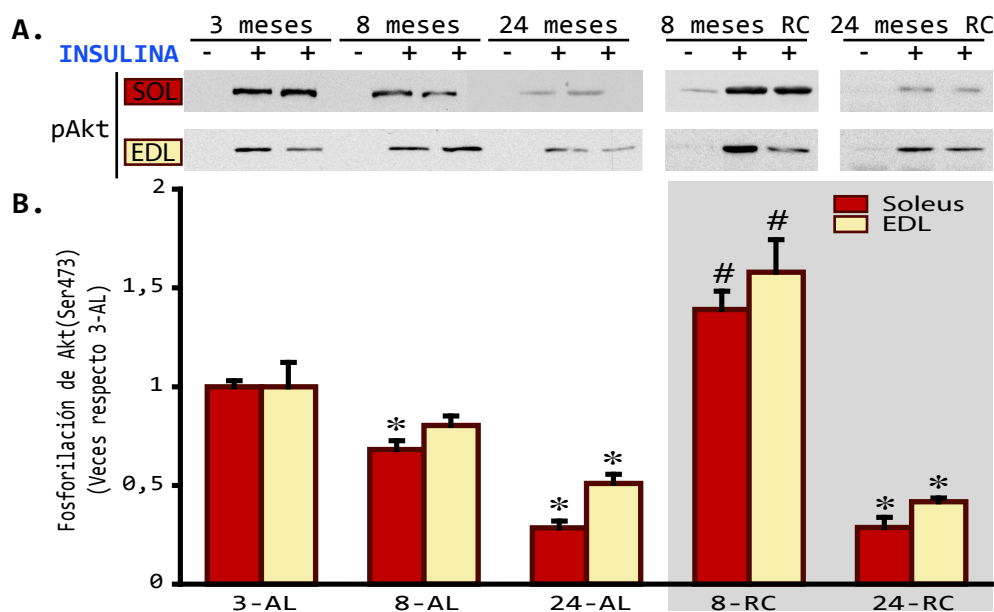


Figura 10. Acción de la insulina *in vivo*: efecto de la edad y la RC en la fosforilación en serina de Akt.

A. Blots representativos de la fosforilación inducida por insulina en el residuo Ser⁴⁷³ de Akt de extractos totales de músculo obtenido 5 min después de la inyección iv de insulina (10 UI/kg). **B.** Cuantificación de la fosforilación en Ser⁴⁷³ de Akt, normalizada por la cantidad total de Akt (blots no mostrados) y referida al valor medio del grupo 3-AL. Los datos se expresan como la media \pm SEM, correspondiente a 4 experimentos independientes, con n=5-6 ratas por cada grupo. * p<0,05 respecto a 3-AL. # p<0,05 respecto al grupo AL de la misma edad.

C. Estudio del transporte de glucosa inducido por insulina *ex vivo*.

Una vez establecidos los cambios en la señalización de insulina en músculo debidos al envejecimiento y la RC, nos planteamos si dichos cambios podrían reflejarse en la alteración del transporte de glucosa estimulado por insulina en el músculo. Para ello determinamos la incorporación de 2-DOG en *strips* de músculos incubados *ex vivo* en presencia o ausencia de insulina. Los resultados recogidos en la figura 11 muestran que la insulina estimula el transporte de glucosa de forma significativa respecto al transporte basal en los dos tipos musculares. El transporte basal en ausencia de insulina no muestra variaciones con la edad ni la RC. Si se compara el transporte en ambos músculos se observa que el soleus tiene una mayor capacidad de incorporar glucosa que el EDL en presencia de la misma dosis de insulina. En la figura se observa cómo el envejecimiento produce un descenso de la capacidad de la insulina para estimular el transporte de glucosa en ambos músculos. En concordancia con lo observado para la fosforilación de IR β y Akt, el efecto de la insulina sobre el transporte de glucosa disminuye significativamente en el soleus procedente de animales de 8 meses de edad, disminución que es aun mayor a los 24 meses de edad. En cambio, el descenso de la incorporación de glucosa en presencia de insulina en EDL es significativo solo a los 24 meses de edad.

Los músculos de ratas de 8 meses sometidas a RC muestran un incremento de la sensibilidad a insulina, alcanzando valores similares a los del grupo control de 3 meses de edad. Por el contrario la RC tardía no provoca cambios en la sensibilidad a insulina, no existiendo diferencias en la estimulación por insulina del transporte de glucosa respecto al grupo 24-AL para ambos músculos.

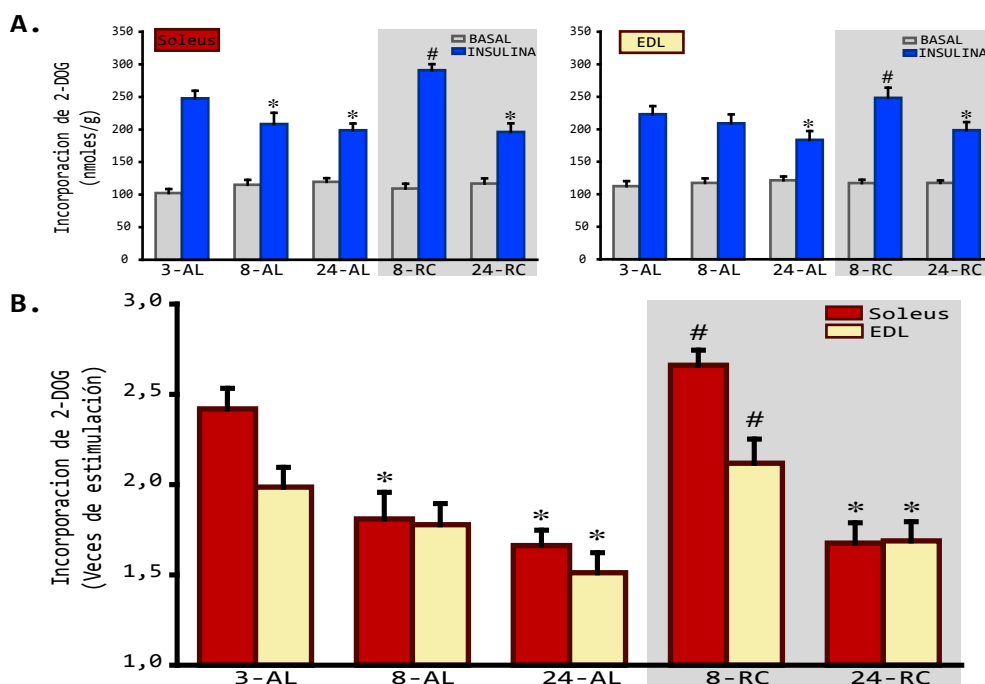


Figura 11. Transporte de glucosa ex vivo: efecto de la edad y la RC en el transporte inducido por insulina.

A. Incorporación de 2-DOG durante 20 minutos en *strips* de músculos esquelético en presencia o ausencia de insulina (100 nM). Los datos se expresan como la media \pm SEM en nmoles/g de músculo de 5-7 experimentos independientes, con $n = 4-6$ ratas por grupo. **B.** Estimulación por insulina del transporte de 2-DOG. Los datos se expresan en veces de estimulación respecto al transporte basal de cada grupo experimental. *, $p < 0,05$ respecto a los valores del grupo de 3-AL del mismo tipo muscular. #, $p < 0,05$ respecto a los valores del grupo AL de la misma edad.

4. EFECTO DIRECTO DE LEPTINA SOBRE EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

El desarrollo de la resistencia a insulina con la edad está probablemente causado por diversas variaciones propias del envejecimiento, tales como los cambios de composición corporal, el metabolismo energético u otros. Entre los cambios observados en la rata Wistar durante el envejecimiento destaca el aumento de la adiposidad visceral y de los niveles de leptina en sangre. Trabajos previos de nuestro grupo pusieron de manifiesto que la leptina ejerce un efecto inhibitorio sobre la acción de insulina en el tejido adiposo, bien actuando de forma central a través del hipotálamo y el SNC o bien actuando directamente sobre el tejido adiposo (Pérez, C et al., 2004; Bonzón-Kulichenko, E et al., 2011). Aunque es conocido que la acción hipotalámica de leptina ejerce un efecto sensibilizador a insulina en el resto de tejidos periféricos, cabe la posibilidad de que su acción directa tenga un efecto inhibitorio sobre la acción de insulina en el músculo esquelético. Dado que la rata Wistar desarrolla resistencia central a leptina con la edad, asociada a niveles muy elevados de leptina en sangre, nos planteamos si el desarrollo de la resistencia a insulina en músculo con la edad podría estar relacionado con una acción directa de la leptina sobre el mismo. Por consiguiente nos planteamos estudiar si el soleus y el EDL muestran respuesta a la acción directa de leptina y si modifica de algún modo la respuesta muscular a la insulina.

A. Análisis de la expresión de proteínas implicadas en la señalización de leptina en músculo esquelético.

En la figura 12 se muestran los patrones de expresión relativa en el músculo esquelético del mRNA de las principales proteínas implicadas en la vía de señalización de leptina. En terminos generales no se observan grandes variaciones en la expresión de las proteínas analizadas en los dos músculos estudiados.

El músculo esquelético expresa las dos principales isoformas del receptor de leptina, Ob-Ra y Ob-Rb, si bien la expresión en EDL de la isoforma Ob-Ra queda fuera de los límites detectables por esta técnica. Ambos receptores muestran una tendencia a disminuir con la edad en ambos músculos, si bien el descenso no llega a alcanzar significatividad estadística. La RC, a ambas edades, induce una ligera recuperación de su expresión hasta niveles similares a las del grupo de 3 meses de edad, pero sin que existan diferencias significativas de expresión respecto a sus respectivos grupos controles.

El patrón de expresión del principal efector de la señal de leptina, Stat-3, no muestra variación alguna ni con la edad y ni tras la RC en ambos músculos. En cambio, la expresión de las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de AMPK, varía de forma significativa en el EDL. En este tipo muscular, AMPK $\alpha 1$ aumenta significativamente a los 24 meses de edad, mientras que AMPK $\alpha 2$ aumenta a los 8 meses de edad para luego descender. Este patrón diferencial para cada isoforma está presente también en soleus pero sin llegar a ser significativo. La RC no cambia significativamente los niveles de expresión en ninguno de los grupos analizados.

Por ultimo, la expresión de SOCS-3, principal regulador negativo de la acción de la leptina, no presenta variación con la edad y/o la RC en soleus. En cambio, en EDL su expresión esta aumentada en animales de 24 meses de edad, sin que la RC a ninguna edad modifique el nivel de expresión. Esto coincide con el aumento del nivel de proteína SOCS-3 mostrado en la figura 6, lo que indicaría una posible resistencia a la acción de la leptina en este tipo muscular solo a edades avanzadas.

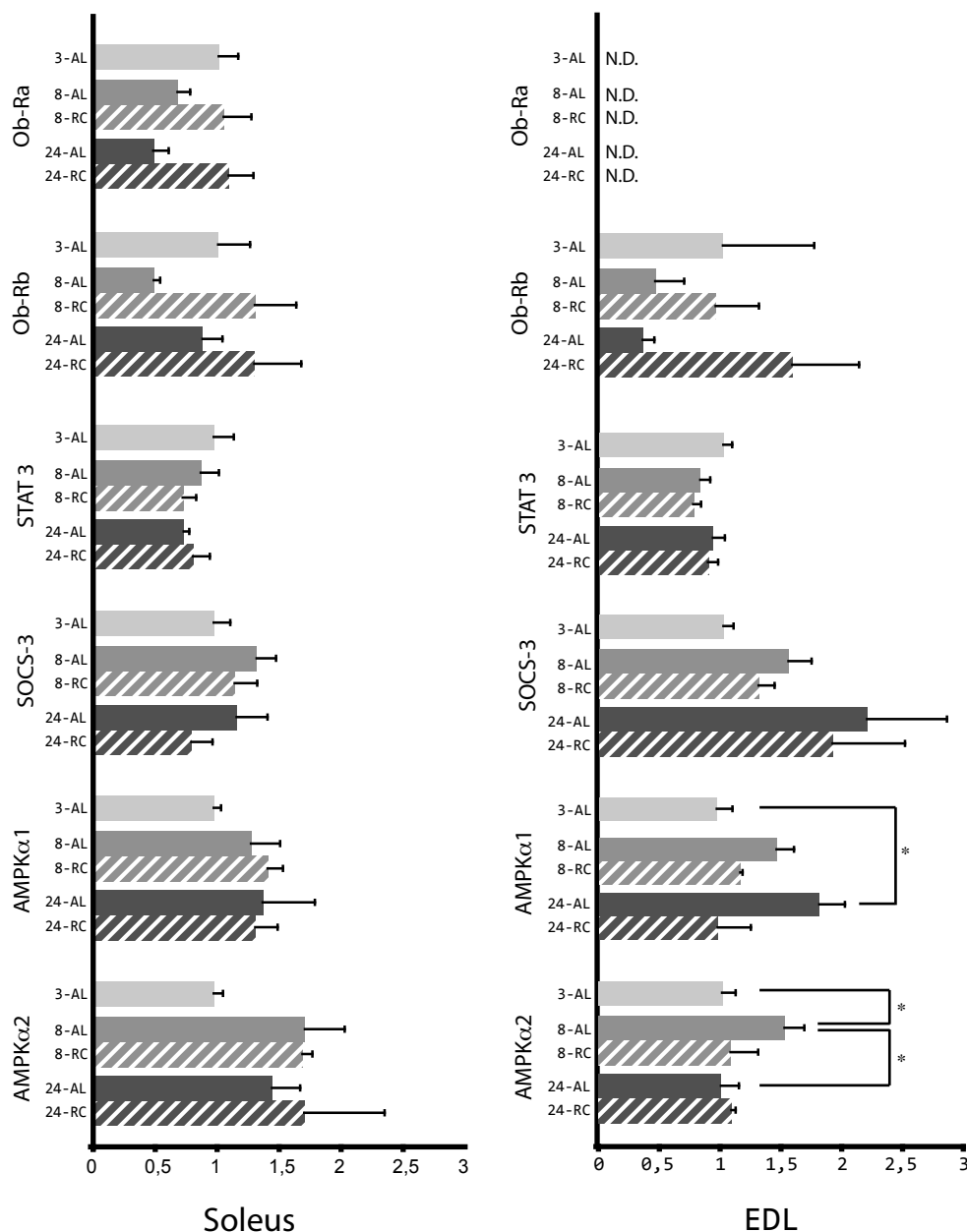


Figura 12. Expresión relativa de los mRNA de las proteínas que participan en la vía de señalización de leptina en el músculo esquelético: efecto de la edad y la RC.

La expresión de los mRNAs se cuantificó mediante la técnica *realtime* PCR (ver Materiales y Métodos) y se normalizó en función de la observada en el grupo control 3-AL. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de expresión respecto al grupo control, de 3 experimentos independientes con $n=4-6$ ratas por grupo. * $p<0,05$ entre los grupos indicados. N.D: valor no determinado,

B. Efecto directo de la leptina *in vivo* sobre el músculo esquelético.

Basándonos en trabajos previos de otros grupos de investigación (Minokoshi, Y et al., 2002) y teniendo en cuenta que el músculo esquelético expresa ambas formas del Ob-R, se diseñó un experimento para analizar la acción directa de la leptina sobre el músculo, minimizando sus efectos centrales. Para ello se utilizó una dosis alta de leptina (0,5 mg/kg) inyectada a través de la vena femoral en ratas de 3 meses de edad. Tras 20 min se analizó su efecto en ambos tipos musculares. Como se puede observar en la figura 13 los datos no reflejan cambios significativos en el nivel de fosforilación de Stat3 o en la expresión de SOCS-3. Sin embargo, sí se observa un aumento significativo de la fosforilación de AMPK α en el residuo Thr¹⁷², lo que refleja la existencia de una respuesta a la acción de leptina tanto en soleus como en EDL. Los datos indican que dicha respuesta es ligeramente superior en soleus en comparación con la observada en EDL (1,72 \pm 0,06 vs. 1,49 \pm 0,13 veces de estimulación respecto al basal, en solues y EDL, respectivamente)

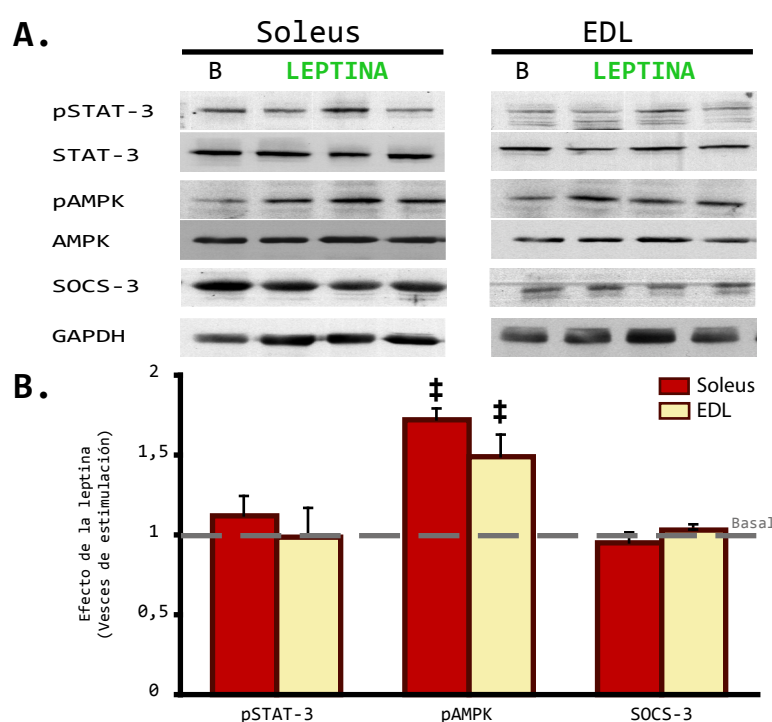


Figura 13. Efecto directo de leptina *in vivo* sobre el músculo esquelético.

A. Extractos totales de soleus y EDL de ratas de 3 meses tratados con suero salino (Basal) o leptina (0,5 mg/kg) administrada iv durante 20 minutos, fueron analizados usando anticuerpos específicos contra las proteínas indicadas. Los residuos fosforilados analizados fueron: Tyr⁷⁰⁵ para STAT3, y Thr¹⁷² para AMPK α .

B. Cuantificación del efecto de la leptina. En el caso de pStat-3 y pAMPK α , la fosforilación observada se corrigió por la cantidad de proteína total y se normalizó respecto al valor basal (valor 1, línea discontinua). En el caso de SOCS-3, su expresión se corrigió por la expresión de GAPDH. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. de las veces de estimulación respecto al valor basal, de 3 experimentos independientes con n=4-5 ratas para cada tratamiento. # indica la existencia de un efecto de leptina, con p<0,05 respecto a su basal.

C. Efecto de la edad y la RC en la acción directa de la leptina *in vivo*.

Una vez establecido que la leptina estimula la fosforilación de AMPK α actuando directamente sobre el músculo esquelético, analizamos este efecto en el resto de grupos experimentales. En la figura 14 se muestra la cuantificación de la fosforilación de AMPK α inducida por leptina respecto a la fosforilación basal. En ella puede observarse que el grado de fosforilación es mayor en el soleus que en el EDL. En ambos músculos se produce un descenso con la edad de la fosforilación de AMPK α , que es significativo a los 8 meses de edad en soleus, y a los 24 meses en EDL. De forma similar a los resultados anteriores, solo la RC temprana tiene efecto sobre la sensibilidad a leptina, pero en este caso de forma diferente para cada tipo muscular. Así, en el soleus, la RC temprana produce un aumento del nivel de fosforilación hasta un nivel similar al de 3 meses, mientras que en EDL provoca el efecto contrario, observándose una reducción significativa de la fosforilación respecto al grupo 8-AL.

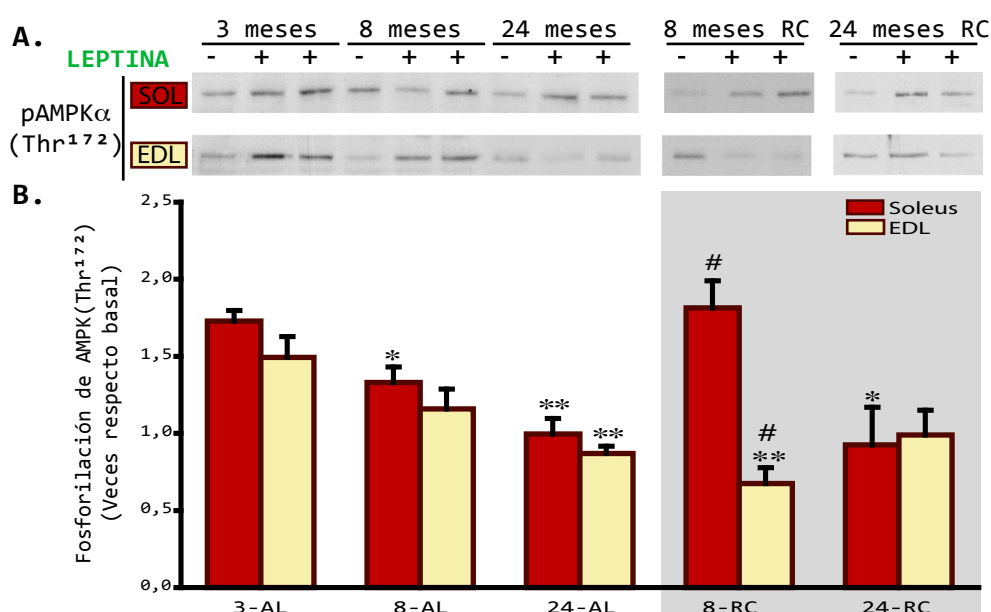


Figura 14. Efecto directo de leptina *in vivo* sobre la estimulación de AMPK α en músculo: efecto de la edad y la RC.

A. Blots representativos de la fosforilación en Thr¹⁷² de AMPK α en extractos totales de músculo obtenidos 20 min después de la inyección iv de leptina (0,5 mg/kg).

B. Estimulación por leptina de la fosforilación de AMPK α . El nivel de fosforilación de AMPK se corrigió por la cantidad total de AMPK y está referido al valor medio de las muestras basales de cada grupo en ausencia de estímulo. Los datos se expresan en veces de estimulación y son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por grupo. * p<0,05 y ** p<0,01 respecto al nivel de estimulación observado en 3-AL; # p<0,05 entre los grupos RC y AL de la misma edad.

D. Efecto directo de leptina *in vivo* sobre la vía de señalización de insulina en el músculo esquelético.

Múltiples trabajos han descrito la interacción entre las vías de señalización de leptina e insulina. Dado que la leptina actúa de forma directa sobre el músculo, decidimos explorar el efecto directo de una dosis elevada de leptina *in vivo* sobre la vía de señalización de insulina en músculos de ratas de 3 meses de edad. Como se muestra en el figura 15 la leptina, actuando directamente, no estimula la fosforilación en tirosina de IR β ni la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³. En cambio, si estimula la fosforilación en residuos de tirosina de IRS-1, aunque el nivel de fosforilación inducido por leptina es inferior al que provoca la insulina *in vivo*.

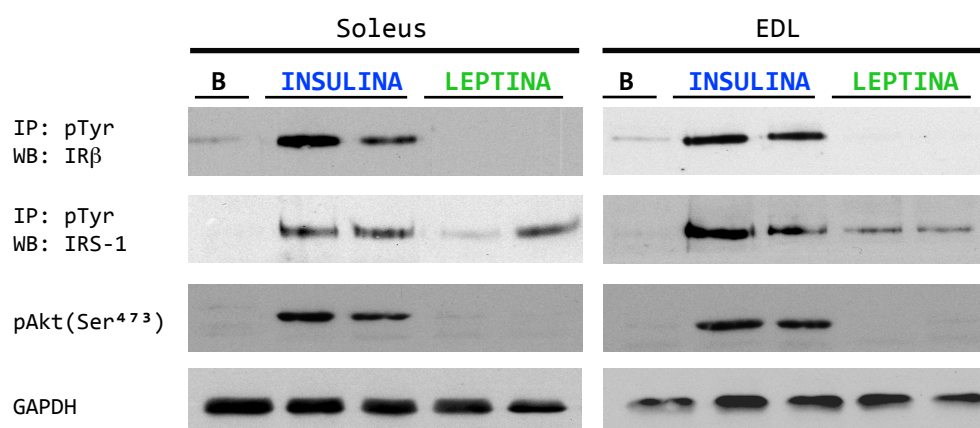


Figura 15. Comparación del efecto *in vivo* de leptina e insulina, sobre la fosforilación de proteínas implicadas en la vía de señalización de insulina en el músculo esquelético de ratas de 3 meses de edad.

Blots representativos donde se compara el efecto de insulina (10 UI/kg, 5 min) y leptina (0,5 mg/kg20 min) administradas iv, sobre la fosforilación de IR β , IRS-1 y Akt(Ser⁴⁷³) en extractos totales de soleus y EDL, respecto a la ausencia de estímulo (B, basal). La fosforilación de IR β e IRS-1 se analizó mediante inmunoprecipiación con anticuerpos anti-pTyr.

El análisis de este efecto en el resto de grupos experimentales se recoge en la figura 16. En ella se muestra la estimulación de la fosforilación de IRS-1 en tirosina por leptina, referida al nivel de fosforilación producido por insulina *in vivo* en músculos de ratas de 3 meses de edad. Como se observa en el grupo 3-AL, el efecto estimulante de la leptina es menor que el de la insulina (62% y 43% del nivel alcanzado por insulina, para soleus y EDL, respectivamente) y también disminuye con la edad, especialmente a los 24 meses de edad. Esta disminución no llega a ser significativa debido que el efecto de leptina sobre la fosforilación de IRS-1 es muy reducido en todos los grupos de edad. La RC no ejerce ningún cambio sobre este efecto de la leptina, excepto en EDL de ratas de 8 meses de edad bajo RC, en las que la fosforilación de IRS-1 estimulada por leptina es prácticamente nula. Este resultado coincide con la reducción de la fosforilación de AMPK α en respuesta a leptina en EDL tras la RC temprana.

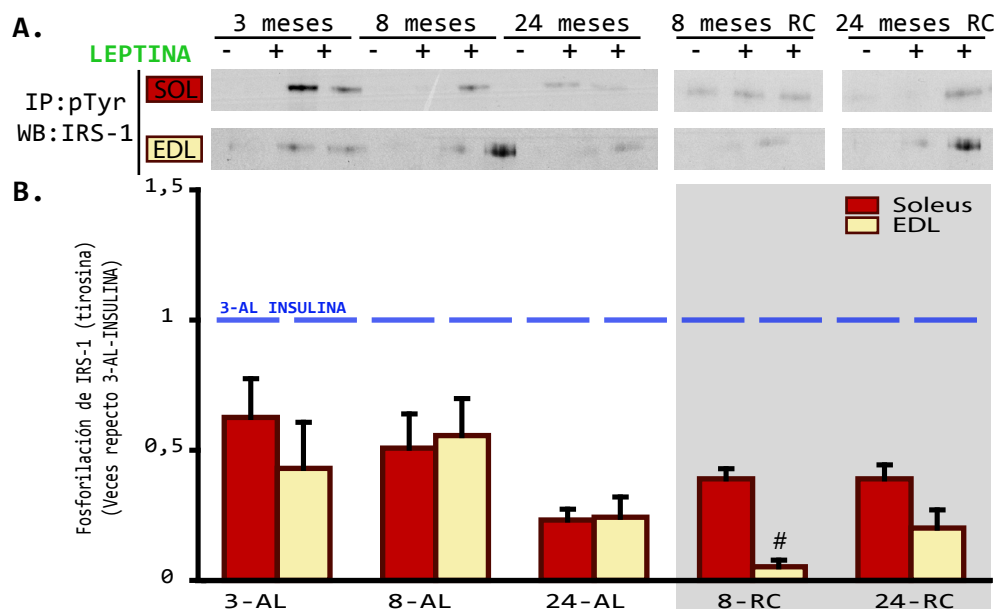


Figura 16. Estimulación por leptina de la fosforilación de IRS-1 en músculo: efecto de la edad y la RC.

A. Blots representativos de la fosforilación en residuos de tirosina de IRS-1 en presencia o ausencia de leptina administrada iv (0,5 mg/kg). Extractos totales de músculos, obtenidos 20 min después de la inyección iv, se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-pTyr. **B.** Cuantificación de la fosforilación de IRS-1 inducida por leptina. Los datos se expresan como media \pm SEM, referidos al valor medio de la fosforilación de IRS-1 inducida por insulina en músculos de 3-AL (línea azul discontinua) y son la media de 3 experimentos independientes, con n= 4-6 ratas por grupo. # p<0,05 respecto al grupo AL de la misma edad.

E. Inducción del transporte de glucosa por acción directa de leptina.

Varios grupos han descrito que la leptina estimula el transporte de glucosa de forma independiente de insulina (Kamohara, S et al., 1997; Ceddia, RB et al., 1998a). Dado que la mayor parte de estos datos proviene de estudios en modelos celulares *in vitro*, nos planteamos ensayar si la leptina, actuando de forma directa sobre *strips* de músculo *ex vivo*, puede estimular el transporte de glucosa. Como ilustra la figura 17, la leptina es capaz de inducir la incorporación de glucosa en músculos aislados de forma independiente de la insulina. Dicha estimulación es, al igual que la estimulación de la fosforilación de IRS-1, inferior a la producida por la insulina.

La capacidad de la leptina de estimular el transporte desciende con la edad. Este descenso es significativo en soleus a los 8 meses de edad y a los 24 meses en EDL. La RC temprana mejora la estimulación por leptina de la incorporación de glucosa solamente en el soleus, aumentando e igualando la captura de glucosa observada en el grupo control 3-AL. En cambio, en EDL esta RC no modifica la estimulación del transporte de glucosa por leptina. Igualmente, la RC tardía no tiene efecto en ninguno de los músculos ensayados.

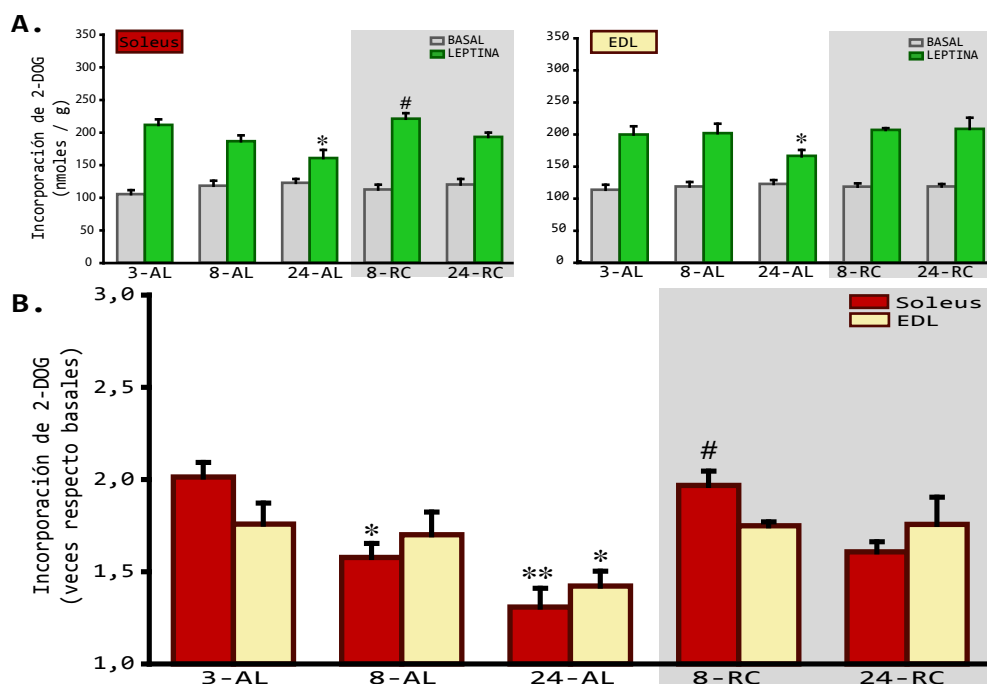


Figura 17. Estimulación por leptina del transporte de glucosa en strips de músculo: efecto de la edad y la RC.

A. Incorporación de 2-DOG durante 20 minutos en músculo esquelético incubado en presencia o ausencia de leptina (5 nM). Los datos se expresan como nmoles/g de músculo y son la media \pm SEM de 5-7 experimentos independientes, con n= 4-6 ratas por grupo. **B.** Estimulación por leptina del transporte de 2-DOG. Los datos se expresan en veces de estimulación respecto al transporte basal de cada grupo. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a la estimulación observada en el grupo control 3-AL. # $p < 0,05$ entre los valores de los grupos AL y RC de la misma edad.

5. EFECTO DE LA ACCIÓN DIRECTA DE LEPTINA SOBRE LA ACCIÓN DE INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Dado que el músculo esquelético presenta diferentes respuestas a la acción directa de la leptina, se investigó si dicha acción interfiere de algún modo con la acción de insulina en el músculo, tanto *in vivo* como *ex vivo*, tal como se ha observado en éste y otros tejidos (Sweeney, G et al., Endocrinology 2001) (Pérez, C et al., Diabetes 2004). Para ello se analizó la acción de insulina tras un pretratamiento con una alta dosis de leptina. Este tratamiento simula un estado hiperleptinémico tal como acontece en la rata Wistar a edad avanzada.

A. Efecto del pretratamiento con leptina sobre la acción de insulina *in vivo* en músculos de ratas de 3 meses de edad.

En los estudios *in vivo* se usaron las mismas dosis de leptina e insulina empleadas anteriormente, y 20 min después de la inyección iv de leptina, se administró insulina iv durante 5 min. El análisis de los niveles de fosforilación de las principales proteínas de la vía de señalización de insulina en músculos de ratas de 3 meses de edad se muestra en la figura 18.

Como se puede comprobar, el pretratamiento con leptina altera la señalización de la insulina *in vivo*, produciendo un descenso de la fosforilación de IR β inducida por insulina de aproximadamente un 41% y un 20% en soleus y EDL respectivamente, aunque solo alcanza significatividad en el soleus. Por otro lado, la fosforilación de IRS-1 estimulada por insulina se ve incrementada en el músculo soleus un 58% tras el tratamiento con leptina. En cambio, en el EDL este aumento de la fosforilación de IRS-1 es de sólo un 25%, no siendo significativo respecto a la estimulación con insulina sola. La ausencia de inhibición de la fosforilación de IRS-1 por el pretratamiento con leptina puede deberse a la capacidad de leptina de estimular por si misma la fosforilación de IRS-1, lo que impide observar, si existe, un efecto inhibitorio sobre la señal de insulina. Sin embargo, este aumento de fosforilación de IRS-1 producido por el pretratamiento con leptina no se ve reproducido en los niveles de fosforilación de Akt en ninguno de los dos tipos musculares, que no varían respecto a los niveles inducidos por insulina.

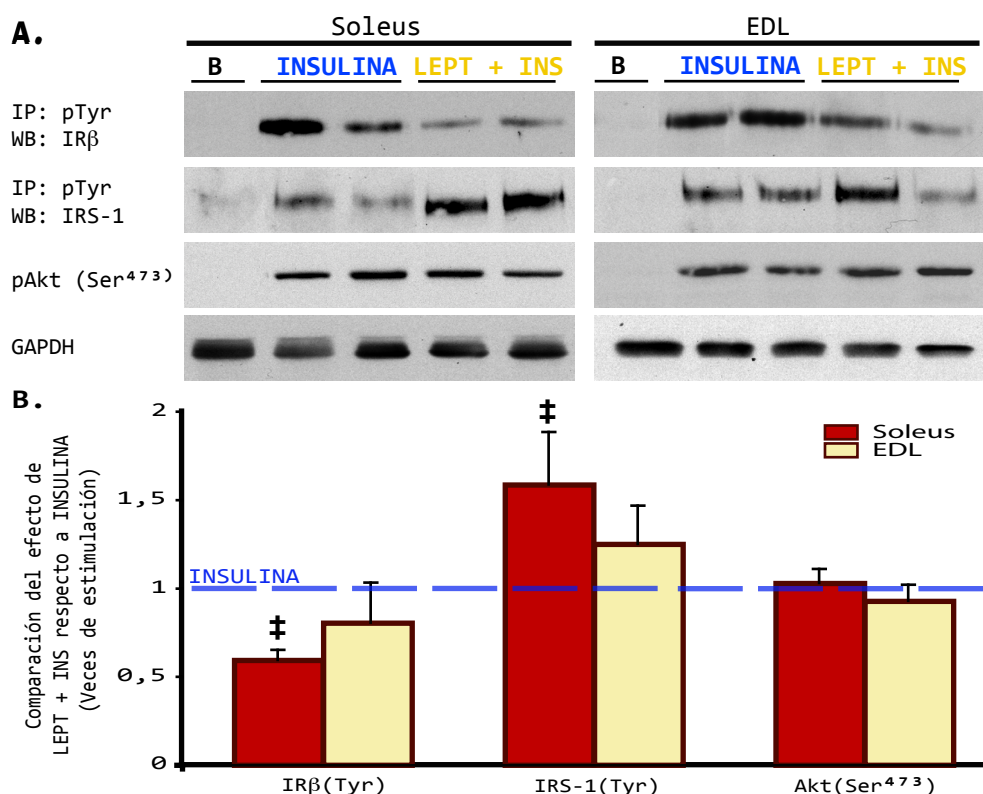


Figura 18. Efecto del tratamiento con leptina sobre la vía de señalización de insulina *in vivo* en el músculo esquelético.

A. Blots representativos de la fosforilación de IRβ, IRS-1 y Akt en extractos totales de músculo de ratas de 3 meses de edad, inducida por el tratamiento con insulina *in vivo* (10 UI/kg, 5 min) después de un tratamiento previo con leptina (0,5 mg/kg, 20 min). **B.** Cuantificación de la fosforilación inducida por insulina en IRβ, IRS-1 y Akt tras el tratamiento previo con leptina. Los datos muestran el valor medio de fosforilación de cada proteína corregido por la cantidad total de ésta y normalizado respecto al valor medio de la estimulación con insulina (valor 1, línea azul). Los datos se expresan como media ± SEM, de 4 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por grupo. # p<0,05 respecto al nivel de estimulación por insulina.

B. Efecto de la edad y la RC en las alteraciones producidas por el pretratamiento con leptina en la acción de insulina *in vivo* en el músculo.

A continuación nos planteamos si el descenso de la sensibilidad del músculo a ambas hormonas con el envejecimiento modifica estos resultados. Para ello analizamos por separado las variaciones de la acción de insulina en cada una de las proteínas implicadas en su vía de señalización antes descritas. Las figuras 19-21 muestran el efecto del tratamiento previo con leptina sobre la estimulación *in vivo* con insulina de la fosforilación de IRβ, IRS-1 y Akt en músculos de animales de diferentes edades y sometidos o no a RC.

Como puede observarse en figura 19, el efecto inhibitorio de leptina sobre la estimulación de la fosforilación de IR β por insulina solo es observable en el músculo soleus y únicamente en los grupos de animales que muestran una mayor sensibilidad a la insulina (grupos 3-AL y 8-RC). En el resto de grupos experimentales este efecto no es observable, aunque no implica necesariamente una ausencia de la acción de leptina, sino que puede deberse al descenso de la acción de insulina observado a partir de los 8 meses de edad en soleus y que impide una disminución mayor por efecto del pretratamiento con leptina. En lo que respecta al EDL, la leptina no parece ejercer un efecto significativo sobre la acción de insulina en ninguno de los grupos experimentales estudiados, indicando un comportamiento diferencial en función del tipo muscular. Este comportamiento diferencial también se observa entre ambos tipos musculares tras la RC a los 8 meses de edad. En soleus, el pretratamiento con leptina bloquea completamente la fosforilación de IR β inducida por insulina. Por el contrario, en EDL el pretratamiento con leptina no bloquea la acción de insulina, sino que incluso la aumenta hasta un nivel similar al grupo control de 3 meses de edad. Este comportamiento dependiente del tipo muscular es similar al observado en la estimulación de AMPK por acción directa de leptina en el grupo de RC temprana.

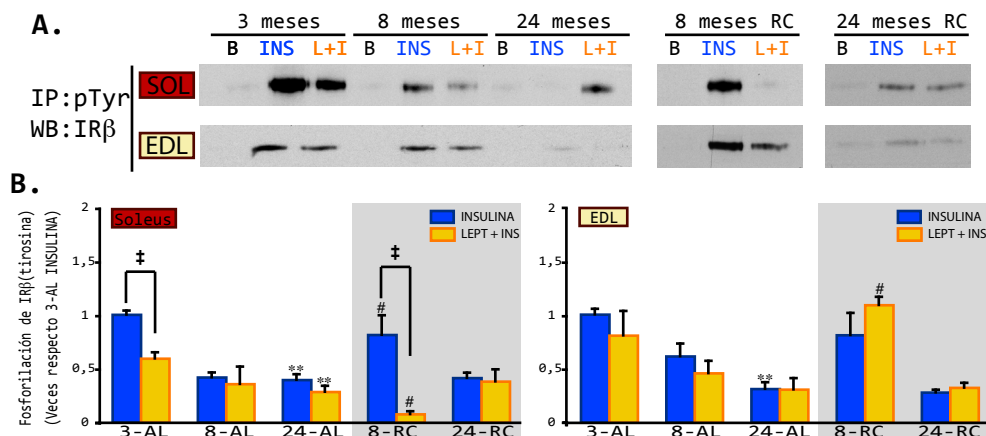


Figura 19. Efecto del tratamiento previo con leptina sobre la fosforilación de IR β inducida por insulina *in vivo* en músculo: efecto del envejecimiento y la RC.

A. Blots representativos de la fosforilación en tirosina de IR β . Extractos totales de músculo obtenidos tras el tratamiento con insulina (10 UI/kg, 5 min) o con leptina (0,5 mg/kg, 20 min) + insulina (10 UI/kg, 5 min) inyectadas iv, fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-pTyr. **B.** Cuantificación de la fosforilación de IR β . La fosforilación de las muestras estimuladas se corrigió por la cantidad de proteína total de IR β y se normalizó respecto al valor medio del grupo 3-AL tratado con insulina. Los datos se expresan en veces de estimulación y son la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por grupo. ** p<0,01 respecto al nivel de 3-AL con el mismo tratamiento; # p<0,05 respecto al grupo 8AL de la misma edad y con el mismo tratamiento, y \pm p<0,05 entre tratamientos con insulina y leptina + insulina.

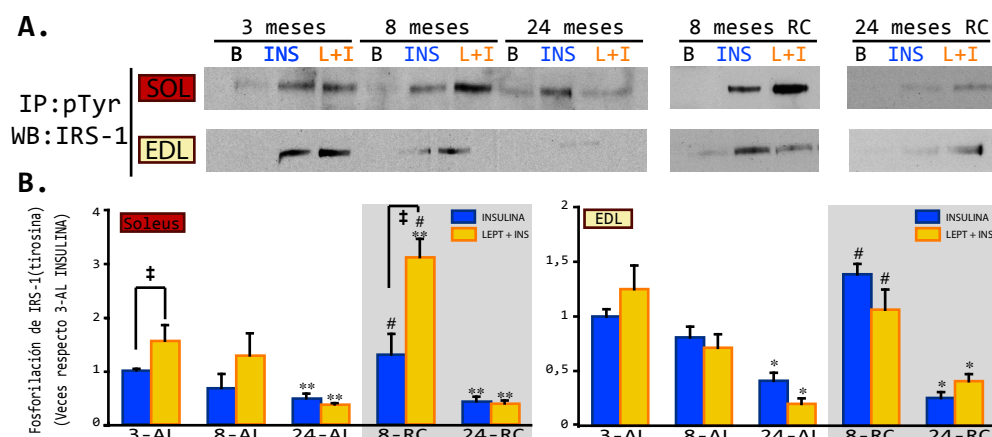


Figura 20. Efecto del tratamiento previo con leptina sobre la fosforilación de IRS-1 inducida por insulina *in vivo* en músculo: efecto del envejecimiento y la RC.

A. Blots representativos de la fosforilación en tirosina de IRS-1. Extractos totales de músculo obtenidos tras el tratamiento con insulina (10 UI/kg, 5 min) o con leptina (0,5 mg/kg, 20 min) + insulina (10 UI/kg, 5 min) inyectadas iv, fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-pTyr. **B.** Cuantificación de la fosforilación de IRS-1. La fosforilación de las muestras estimuladas se corrigió por la cantidad de proteína total de IRS-1 y se normalizó respecto al valor medio del grupo 3-AL tratado con insulina. Los datos se expresan en veces de estimulación y son la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por grupo.

* $p < 0,5$ y ** $p < 0,01$ respecto al nivel de 3-AL con el mismo tratamiento; # $p < 0,05$ respecto al grupo 8AL de la misma edad y con el mismo tratamiento; \pm $p < 0,05$ entre tratamientos con insulina y leptina + insulina.

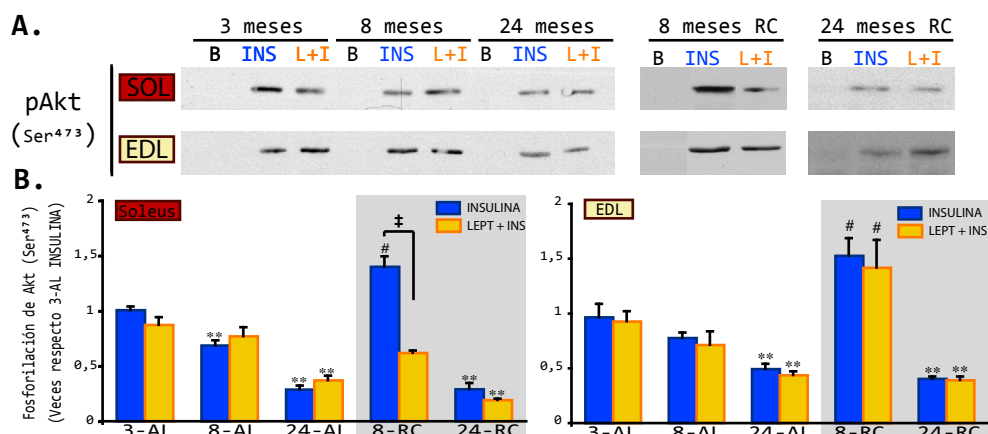


Figura 21. Efecto del tratamiento previo con leptina sobre la fosforilación de Akt inducida por insulina *in vivo* en músculo: efecto del envejecimiento y la RC.

A. Blots representativos de la fosforilación en Ser⁴⁷³ de Akt en extractos totales de músculo obtenidos tras el tratamiento con insulina (10 UI/kg, 5 min) o con leptina (0,5 mg/kg, 20 min) + insulina (10 UI/kg, 5 min) inyectadas iv. **B.** Cuantificación de la fosforilación de Akt. La fosforilación de las muestras estimuladas se corrigió por la cantidad total de Akt y se normalizó respecto al valor medio del grupo 3-AL tratado con insulina. Los datos se expresan en veces de estimulación y son la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por grupo.

** $p < 0,01$ respecto al nivel de 3-AL con el mismo tratamiento; # $p < 0,05$ respecto al grupo 8AL de la misma edad y con el mismo tratamiento, y \pm $p < 0,05$ entre tratamientos con insulina y leptina + insulina.

En el caso de los niveles de fosforilación en tirosina de IRS-1, recogidos en la figura 20, se observa como el pretratamiento con leptina produce un aumento de la fosforilación inducida por insulina, aunque solo es significativo de nuevo, en soleus de 3 meses de edad y en soleus de 8 meses tras la RC. En el resto de grupos de edad y dieta para soleus y en todos los grupos experimentales del EDL no hay cambios en la acción de la insulina sobre la fosforilación de IRS-1. La intensidad del aumento de la fosforilación de IRS-1 en el soleus del grupo 8-RC es muy significativa y refuta la idea de que el nivel de fosforilación de IRS-1 alcanzado tras el pretratamiento sea debido a la adición de los efectos de leptina e insulina.

La figura 21 recoge los niveles de fosforilación de Akt en respuesta a los estímulos. En ella solo se observa la alteración de la acción de insulina por el pretratamiento con leptina en el músculo soleus tras la RC a los 8 meses de edad, donde la estimulación de la fosforilación por insulina está reducida significativamente. Esto implica que el aumento de la fosforilación de IRS-1 descrito en soleus del grupo 8-RC no conlleva la transmisión de esa señal hasta el nivel de Akt. De nuevo, el músculo EDL no muestra ninguna alteración de la acción de insulina al nivel de la fosforilación de Akt por efecto del pretratamiento con leptina.

C. Efecto del pretratamiento con leptina *ex vivo* en la incorporación de glucosa inducida por insulina en músculo aislado.

Con el fin de profundizar en el estudio de los efectos directos de leptina sobre la acción de insulina en el músculo esquelético, se analizó el efecto del pretratamiento *ex vivo* de *strips* de músculo con altas dosis de leptina sobre la capacidad de la insulina de estimular la captura de glucosa.

En la figura 22 se compara el transporte inducido por insulina con o sin pretratamiento con leptina en todos los grupos experimentales. En ella podemos observar como en el soleus el pretratamiento con leptina provoca una disminución de la estimulación del transporte de glucosa estimulado por insulina en animales de 3 meses de edad. Esto coincide con los efectos observados tras el tratamiento *in vivo* con leptina en la estimulación por insulina de la fosforilación de IR β y Akt. Este efecto de inhibición de leptina sobre el transporte inducido por insulina desaparece en músculos de animales de 8 y 24 meses, posiblemente debido al descenso de la acción de insulina en estos mismo grupos. En ratas de 8 meses de edad sometidas a RC, caracterizadas por tener una mayor sensibilidad a insulina, se puede observar un efecto inhibitor del pretratamiento con leptina sobre la estimulación del transporte de glucosa por insulina, tanto en soleus como en EDL. En el resto de los grupos de edad y dieta el músculo EDL no muestra diferencias significativas entre el transporte de glucosa estimulado por insulina con y sin pretratamiento previo con altas dosis de leptina.

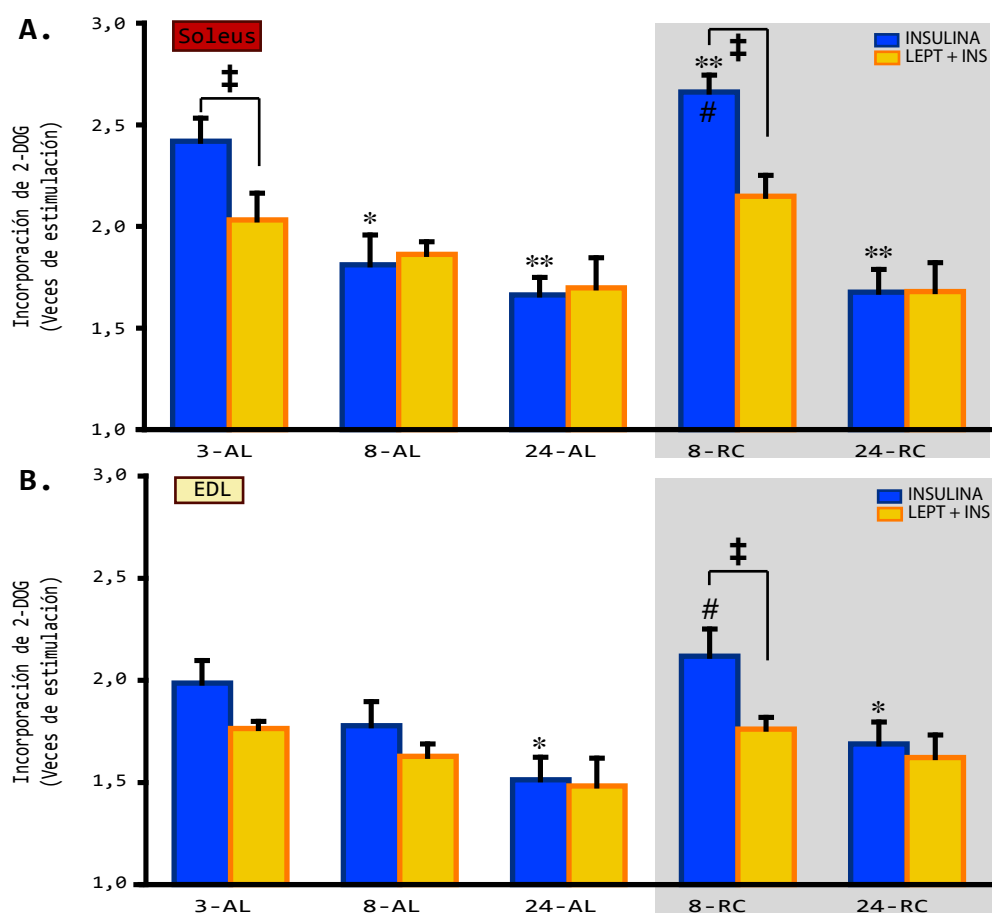


Figura 22. Efecto del preincubación con altas dosis de leptina en la incorporación de glucosa inducida por insulina en *strips* de músculos: efecto del envejecimiento y la RC.

Incorporación de 2-DG durante 20 min en *strips* de músculo soleus (**A.**) y EDL (**B.**) tratados *ex vivo* con insulina 100 nM (barras azules) o con leptina 5 nM durante 20 min antes del tratamiento con insulina (barras naranjas). Los datos se expresan en veces de estimulación respecto al transporte basal en ausencia de estímulo y son la media \pm SEM de 4-7 experimentos independientes, con $n=4-6$ ratas por grupo. * $p<0,05$ y ** $p<0,001$ respecto al valor medio del grupo 3-AL tratado con insulina. # $p<0,05$ respecto al grupo AL de la misma edad y tratamiento; y \pm $p<0,05$ entre los tratamientos insulina y leptina + insulina en el mismo grupo de edad.

6. POSIBLE PAPEL DE p38 EN LA INTERACCIÓN DE LAS SEÑALES DE LEPTINA E INSULINA EN MÚSCULO.

Como se detalla en la introducción, existe una gran controversia sobre la posibilidad de que p38 intervenga en el proceso de captura de glucosa estimulado por insulina. Algunos grupos de investigación han propuesto que la acción de insulina provoca la fosforilación de p38 y que esta activación es necesaria para el correcto transporte de glucosa mediado por GLUT-4, si bien la mayoría de estos trabajos utilizaron modelos celulares *in vitro* y el inhibidor específico de p38, el SB203580, que provoca la disminución del transporte de glucosa estimulado por insulina. Partiendo de estos hechos, quisimos investigar si p38 interviene en los mecanismos de interacción de la acción de insulina y leptina en el músculo esquelético que hemos descrito anteriormente.

A. Efecto de insulina y leptina en la fosforilación de p38 en el músculo de ratas de 3 meses de edad.

Para este estudio se utilizaron las mismas muestras usadas para el análisis *in vivo* de la acción de insulina y leptina. La figura 23 muestra el nivel de fosforilación de los residuos Thr¹⁸⁰ y Tyr¹⁸² de p38 en músculos de ratas de 3 meses de edad. La insulina *in vivo* estimula su nivel de fosforilación respecto al nivel basal, tanto en soleus (62%) como en EDL (71%). En cambio, la acción directa de la leptina reduce su nivel de fosforilación un 40% aproximadamente en ambos músculos con respecto al basal, pero no llega a alcanzar diferencias significativas en ninguno de los dos casos. El pretratamiento con una alta dosis de leptina *in vivo* produce una inhibición de la estimulación con insulina de la fosforilación de p38 manteniendo la fosforilación a un nivel similar al del grupo basal.

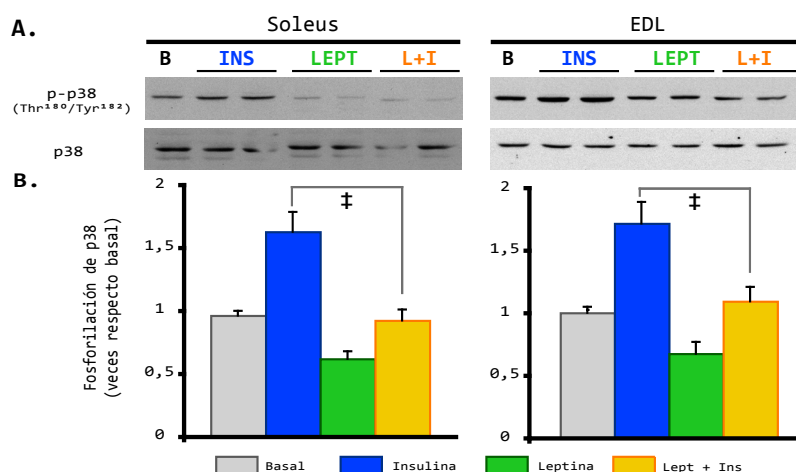


Figura 23. Efecto del tratamiento in vivo con insulina, leptina o leptina + insulina sobre la fosforilación de p38 en músculo esquelético.

A. Blots representativos de la fosforilación en Thr¹⁸⁰ y Tyr¹⁸² de p38 y de la cantidad total de proteína en extractos totales de músculo soleus y EDL de ratas de 3 meses de edad obtenidos tras la inyección iv con insulina (10 UI/kg, 5 min), leptina (0,5 mg/kg, 20 min) o leptina + insulina (mismas dosis y tiempos). **B.** Cuantificación de la fosforilación de p38, corregida en función de la cantidad total de proteína. Los valores se expresan como media \pm SEM de las veces de estimulación respecto a la observada en ausencia de estímulo, de 4 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por cada tratamiento. # $p < 0,05$ entre las condiciones señaladas

B. Efecto de la edad y la RC sobre la acción de insulina y leptina sobre la fosforilación de p38 en músculo.

En las figuras 24 y 25 se muestran los efectos del tratamiento *in vivo* con insulina, leptina o leptina antes de insulina sobre la fosforilación de p38 en el resto de grupos experimentales. La cuantificación de estos efectos se realizó respecto a los niveles de fosforilación en condiciones basales de cada grupo. En ambas figuras se observa cómo la insulina estimula la fosforilación de p38 y cómo este efecto desciende con la edad, siendo la reducción significativa a los 24 meses de edad en ambos músculos. De acuerdo con los resultados de la acción de insulina *in vivo* en el músculo, la RC temprana aumenta de forma muy significativa la fosforilación inducida por insulina en ambos músculos respecto a su control de edad, sobrepasando los niveles del grupo control de 3 meses de edad. Este aumento de la sensibilidad a insulina y de la fosforilación de p38 es mayor en soleus que en EDL, con un aumento de 2.5 y 2.2 veces respecto al basal del grupo 8-RC, respectivamente.

La acción directa de leptina sobre el músculo produce una reducción de la fosforilación de p38 respecto al nivel basal de fosforilación de cada grupo experimental, la cual no muestra variación ni con la edad ni con la RC en ambos músculos analizados.

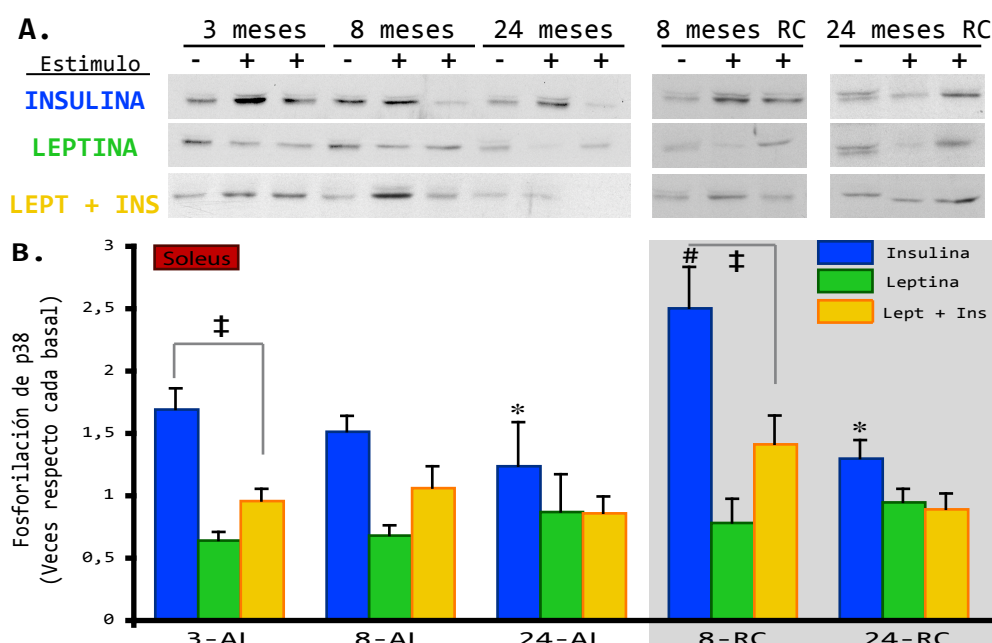


Figura 24. Efecto del envejecimiento y la RC sobre la capacidad de estimulación de la fosforilación de p38 mediante tratamientos *in vivo* con insulina, leptina o leptina + insulina en soleus.

A. Blots representativos de la fosforilación en Thr¹⁸⁰ y Tyr¹⁸² de p38 en extractos totales de músculo soleus obtenidos tras la inyección iv de insulina (10 UI/kg), leptina (0,5 mg/kg, 20 min) o leptina + insulina a las mismas condiciones. **B.** Cuantificación de la fosforilación de p38, corregida por la cantidad de proteína total (blots no mostrados). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de estimulación de la fosforilación respecto a la observada en condiciones basales para cada grupo experimental, y corresponden a 3-4 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por grupo. * p<0,05 respecto a 3-AL tratado con insulina. # p<0,05 respecto al nivel del grupo AL de la misma edad; y †p<0,05 entre los tratamientos señalados.

Estos resultados parecen contradecir el desarrollo de resistencia periférica a leptina con la edad descrito anteriormente y sugieren que el efecto inhibitorio de la leptina sobre la fosforilación de p38 no está afectado por la edad ni la RC. Esto implica a su vez que el mecanismo celular de esta inhibición deber ser diferente al de otras acciones producidas por la leptina, tales como la estimulación de la fosforilación de AMPK e IRS-1 y del transporte de glucosa

Sin embargo este mecanismo si afecta a la acción de la insulina sobre p38, dado que el pretratamiento con leptina bloquea la fosforilación de p38 inducida por insulina, pero solo en los grupos experimentales que muestran mayor sensibilidad a esta hormona. Si se observan las figuras 24 y 25, el bloqueo de la estimulación por insulina de la fosforilación de p38 sólo es significativo en ambos músculos de ratas de 3 meses de edad y a los 8 meses tras la RC. La capacidad de bloqueo del pretratamiento con leptina parece ser similar en ambos músculos, mostrando una reducción del nivel de fosforilación de p38 del 27% y del 33% respecto al nivel inducido por insulina en soleus y EDL de ratas de 3 meses de edad, respectivamente. Esta capacidad de reducción disminuye con la edad y no alcanza significatividad, debido posiblemente a la disminución de la acción de insulina sobre esta proteína. En cambio, cuando se recupera la sensibilidad a insulina tras la RC temprana, este efecto inhibitorio es aun mayor, alcanzando el 44% (soleus) y 45% (EDL) respecto al nivel de fosforilación estimulado por insulina.

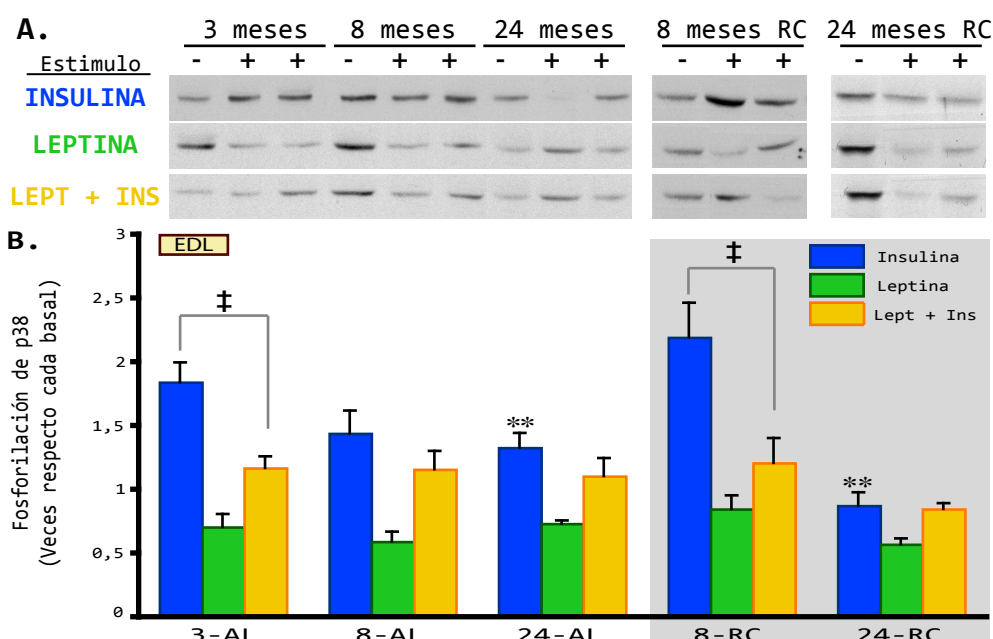


Figura 25. Efecto del envejecimiento y la RC sobre la capacidad de estimulación de la fosforilación de p38 mediante tratamientos *in vivo* con insulina, leptina o leptina + insulina en EDL.

A. Blots representativos de la fosforilación en Thr¹⁸⁰ y Tyr¹⁸² de p38 en extractos totales de músculo EDL obtenidos tras la inyección iv de insulina (10 UI/kg), leptina (0,5 mg/kg, 20 min) o leptina + insulina a las mismas condiciones. **B.** Cuantificación de la fosforilación de p38, corregida por la cantidad de proteína total (blots no mostrados). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de estimulación de la fosforilación respecto a la observada en condiciones basales para cada grupo experimental, y corresponden a 3-4 experimentos independientes, con n=4-6 ratas por grupo. * $p < 0,05$ respecto a 3-AL tratado con insulina. # $p < 0,05$ respecto al nivel del grupo AL de la misma edad; y $\#p < 0,05$ entre los tratamientos señalados.

C. Papel de p38 en el transporte de glucosa inducido por insulina.

Como ya ha sido referido, existe gran controversia sobre la implicación de p38 en la exocitosis y activación de GLUT-4, en la estimulación por insulina del transporte de glucosa. Con el fin de confirmar la posible relación entre la inhibición de la estimulación por insulina de la fosforilación de p38 y del transporte de glucosa, utilizamos dos inhibidores específicos de la activación de p38 en el estudio del transporte de glucosa estimulado por insulina en músculos de ratas de 3 meses de edad.

El SB203580 es un inhibidor específico de p38 derivado de los imidazoles del cual se ha descrito que tiene una IC_{50} igual o menor de $1 \mu M$. Para no modificar las condiciones experimentales de nuestro protocolo, los *strips* de músculo se pretrataron con SB203580 antes del estímulo con insulina, de forma similar al pretratamiento con leptina. Las concentraciones del inhibidor ensayadas fueron 1 y $10 \mu M$. En la figura 26.A se muestra como el tratamiento con SB203580 $10 \mu M$ no modifica el transporte de glucosa en ausencia de insulina. En cambio, el pretratamiento con SB203580 produce una inhibición del transporte inducido por insulina de forma dosis dependiente, que es significativo en ambos tipos músculos con la concentración mas alta ($10 \mu M$).

Dado que el efecto de SB203580 ha sido cuestionado en estudios previos de la estimulación del transporte de glucosa en líneas celulares sensibles a insulina (Antonescu, CN et al., 2005; Ribé, D et al., 2005) se utilizó el mismo protocolo experimental con un inhibidor diferente: el BIRB 796, un compuesto derivado de la urea. Hasta el momento no existen datos sobre su utilización en experimentos de este tipo, por lo que, a pesar de que su IC_{50} es del rango nM, decidimos usarlo con las mismas concentraciones que el SB203580. Debido a su naturaleza apolar, se usó DMSO al 0,01% como vehiculo, el cual se añadió a todas las condiciones del ensayo, para no modificar significativamente el transporte de glucosa. En la figura 26.B se observa cómo el pretratamiento con BIRB 796, usando dos concentraciones diferentes, bloquea parcialmente la incorporación de glucosa inducida por insulina en músculo EDL. Sin embargo, en soleus el efecto del BIRB 796 fue diferente: la dosis inferior ($1 \mu M$) bloquea la acción de insulina, pero la dosis superior ($10 \mu M$) no modifica la acción de insulina. Este efecto puede ser debido al uso de una concentración demasiado elevada del inhibidor que esté actuando de forma no especifica sobre otras proteínas en este músculo. Este dato dispar deberá ser estudiado con más profundidad.

Los datos obtenidos utilizando los inhibidores de p38 sugieren que esta proteína es necesaria para la correcta estimulación del transporte de glucosa por insulina. Por otro lado, el pretratamiento con leptina inhibe la fosforilación de p38 estimulada por la insulina, lo que podría estar relacionado con el efecto de altas dosis de leptina en la inhibición del transporte de glucosa inducido por insulina en músculo esquelético. El mecanismo de acción de la leptina sobre p38 parece ser indirecto e independiente de los efectos de esta hormona sobre la fosforilación de AMPK e IRS-1 y sobre su capacidad de inducir el transporte de glucosa de forma independiente de insulina.

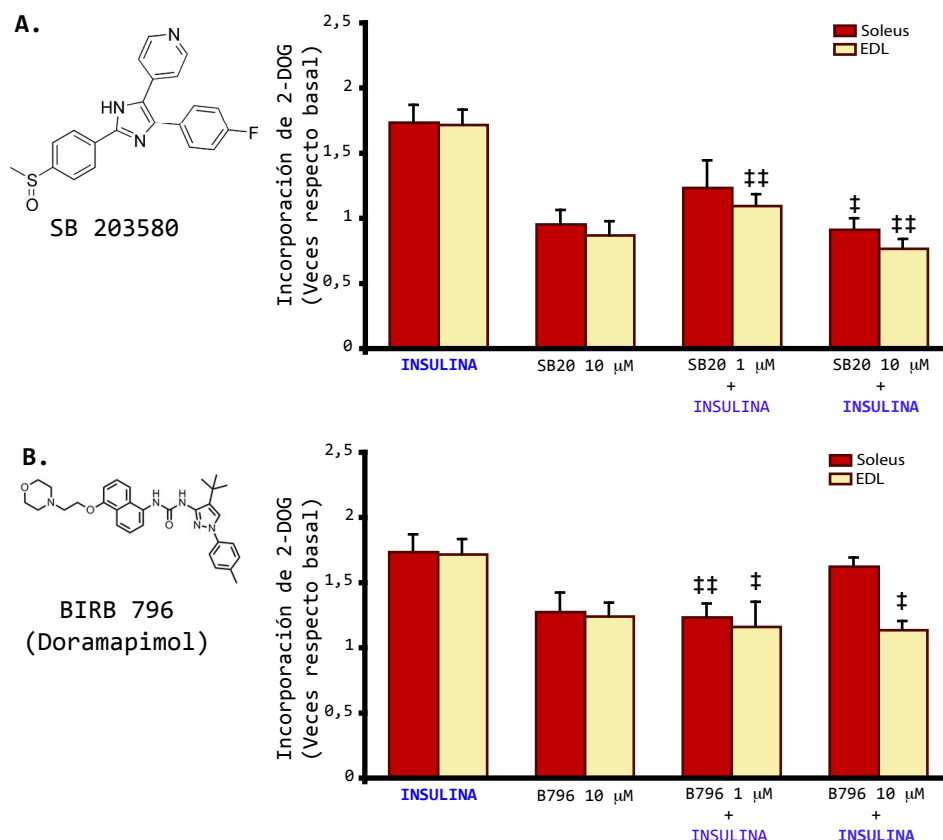


Figura 26. Efecto de la inhibición de p38 en el transporte de glucosa inducido por insulina en músculo esquelético de ratas de 3 meses.

A. Estructura del compuesto SB203580 y cuantificación de su efecto en la incorporación de glucosa inducida por insulina en *strips* de soleus y EDL incubados *ex vivo* en presencia de los estímulos indicados. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de estimulación de la incorporación de 2-DOG durante 20 minutos respecto al transporte basal. \dagger $p < 0,05$ y $\dagger\dagger$ $p < 0,001$ respecto al nivel de estimulación por insulina para el mismo tipo muscular. **B.** Estructura del compuesto BIRB 796 y cuantificación de su efecto en la incorporación de glucosa inducida por insulina en *strips* de soleus y EDL incubados *ex vivo* en presencia de los estímulos indicados. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de estimulación de la incorporación de 2-DOG durante 20 minutos respecto al transporte basal. \dagger $p < 0,05$ y $\dagger\dagger$ $p < 0,001$ respecto al nivel de estimulación por insulina para el mismo tipo muscular.

7. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS DE ALTAS DOSIS DE LEPTINA EN RATAS DE 3 MESES DE EDAD.

Los datos presentados en este trabajo sobre el efecto inhibitorio de una dosis alta de leptina *in vivo* y *ex vivo* en la acción de insulina en el músculo esquelético parecen contradecir la idea general de que la leptina es un factor que sensibiliza frente a la acción de insulina. Para analizar esta cuestión con mayor profundidad, planteamos un experimento que nos permitiera comprobar la diferencia entre las acciones central y periférica de la leptina, sobre la acción de insulina en el músculo.

Mediante la implantación intracerebroventricular (icv) de mini bombas osmóticas en ratas de 3 meses de edad pudimos estudiar el efecto del tratamiento crónico y central con dos dosis de leptina (0,2 y 10 $\mu\text{g}/\text{día}$). Al término de este tratamiento central ensayamos la captura de glucosa en *strips* de músculos *ex vivo* con los mismos estímulos anteriormente descritos: insulina 100 nM, leptina 5 nM y una preincubación con leptina de 20 minutos previa a la estimulación con insulina con las mismas dosis. De esta forma, el tratamiento central, a través del eje hipotálamo – SNC, queda separado de los efectos directos de la leptina en el músculo esquelético

A. Efectos fisiológicos del tratamiento central con leptina.

Resultados previos de nuestro grupos indican que el tratamiento central con leptina produce un descenso de la ingesta y del peso corporal (Fernández-Galaz, C et al., 2002; Bonzón-Kulichenko, E et al., 2011). Las figuras 27 y 28 confirman estos efectos. El tratamiento central durante 7 días con leptina produce un descenso de la ingesta media diaria que llega a ser muy significativo con la dosis mayor de leptina (10 $\mu\text{g}/\text{d}$). Este descenso de la ingesta está asociado a una reducción del incremento de peso ($296 \pm 13,2 \text{ g}$ vs. $325 \pm 7,6 \text{ g}$ en el día 7 entre el grupo leptina 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ y el grupo control, respectivamente. $p < 0,05$ mediante test T de Student) y de los niveles de glucosa.

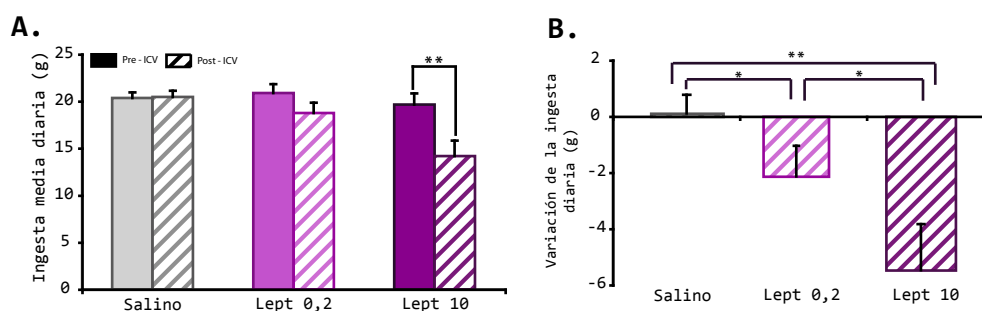


Figura 27. Acción central de leptina: efecto sobre la ingesta.

A. Ingesta diaria antes y después del tratamiento central. Los valores muestran el promedio de la ingesta diaria durante 6 y 7 días, antes y después de la infusión icv de suero salino o de dos dosis diferentes de leptina. ** $p < 0,001$.

B. Variación de la ingesta media diaria tras el tratamiento icv con suero salino o dos dosis diferentes de leptina. Los datos se expresan como media \pm SEM de $n=6$ ratas por tratamiento. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ entre los diferentes tratamientos.

La glucemia tras ayuno nocturno desciende de forma significativa tras el tratamiento central con la dosis más alta de leptina ($129,33 \pm 4,09$ vs. $96,8 \pm 4,7$ mg/dl, antes y después del tratamiento respectivamente. $p=0,0389$ mediante test T-Student pareado). En cambio, el tratamiento central con suero salino y con la dosis menor de leptina ($0,2 \mu\text{g/d}$) no indujo cambios significativos entre los niveles de glucemia antes y después del tratamiento ($p>0,05$ mediante test t-Student pareado para ambos casos).

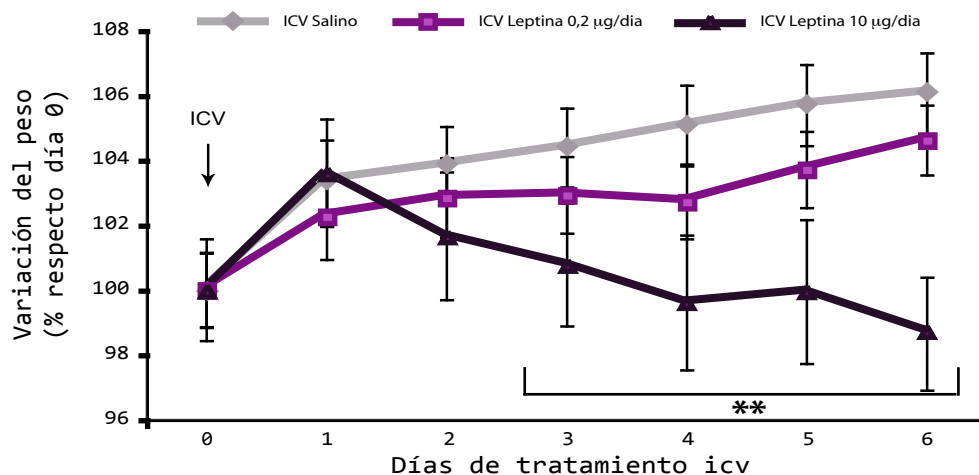


Figura 28. Acción central de leptina: efecto sobre el peso corporal.

Evolución del peso durante el tratamiento icv con suero salino o con dos dosis diferentes de leptina. Los datos corresponden al peso medio \pm SEM de $n=6$ ratas por cada tratamiento, y se expresan como el porcentaje respecto al peso en el día 0. ** $p<0,01$ entre el grupo tratado con leptina $10 \mu\text{g/d}$ y el grupo control.

B.Efectos del tratamiento central con leptina en la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético.

Junto a los cambios fisiológicos descritos, analizamos si la acción central de la leptina incrementa la sensibilidad del músculo esquelético frente a insulina. La figura 29 muestra la incorporación de glucosa estimulada por insulina en músculo esquelético tras el tratamiento central con leptina. En ella se observa que el tratamiento central con la dosis mayor de leptina ($10 \mu\text{g/d}$) produce un incremento de la sensibilidad a la insulina en el soleus. Por el contrario, en el EDL no se aprecia una mejora de la sensibilidad a la insulina tras el tratamiento central con leptina.

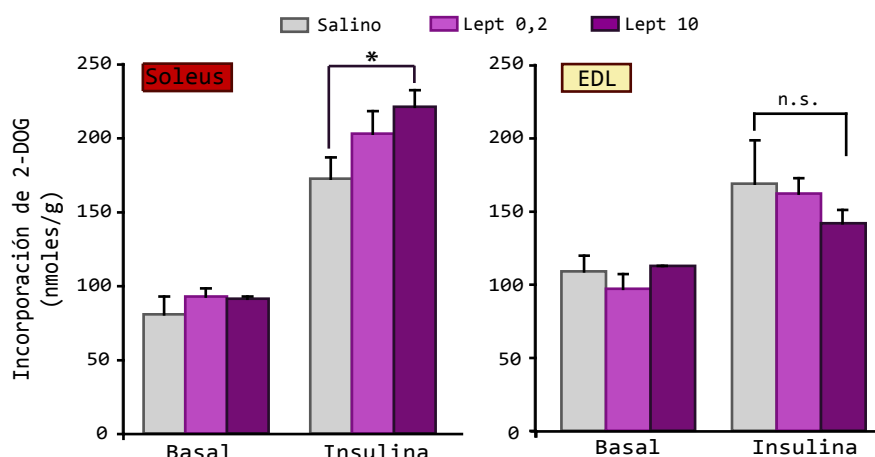


Figura 29. Efecto del tratamiento central con leptina sobre la sensibilidad a insulina del músculo esquelético.

Incorporación de 2-DOG durante 20 min en *strips* de soleus y EDL obtenidos de ratas de 3 meses tratadas icv con suero salino o dos dosis de leptina (0,2 y 10 μ g/d), incubados *ex vivo* en ausencia o presencia de insulina (100 nM). Los datos se expresan en nmoles/g de tejido, y corresponden a la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, con n=6 ratas por tratamiento. * $p < 0,05$ entre los tratamientos señalados; n.s. = diferencias no significativas.

C. Comparación de los efectos centrales y periféricos de leptina sobre la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético.

Por último, estudiamos si el efecto inhibitorio del transporte de glucosa estimulado por insulina causado por la acción directa de leptina *ex vivo* es modificado por el aumento de la sensibilidad a insulina resultante del tratamiento central con leptina. La figura 30 recoge los resultados de la incorporación de glucosa en *strips* de músculo tras dicho tratamiento central con leptina, usando las mismas condiciones para los estímulos que en anteriores experimentos.

En ella se observa como el soleus responde mejor a los estímulos *ex vivo* y a los efectos causados por el tratamiento central con leptina. Sin embargo, el EDL no muestra ninguna diferencia significativa en el transporte de glucosa ni entre los tratamientos *ex vivo* ni entre los tratamientos intracerebroventriculares. Si se analizan los resultados del soleus, podemos extraer varias conclusiones: a) la sensibilidad a insulina aumenta tras el tratamiento central con leptina (ver también figura 24); b) el soleus parece que también aumenta su sensibilidad a leptina: la incorporación de glucosa inducida por leptina sola muestra una tendencia a aumentar tras el tratamiento central, que no llega a ser significativa entre los grupos; y c) el pretratamiento con una dosis alta de leptina *ex vivo* bloquea parcialmente el transporte inducido por insulina, independientemente de la mejora de la sensibilidad a insulina obtenida por el tratamiento central con leptina.

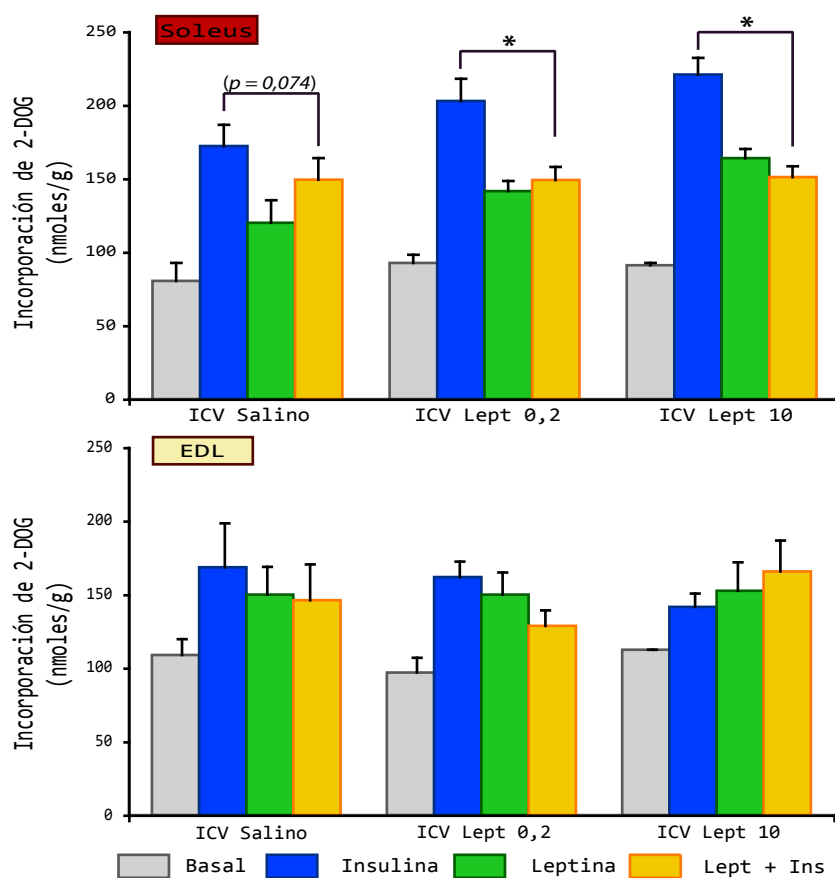


Figura 30. Efecto directo de una dosis alta de leptina en la estimulación del transporte de glucosa *ex vivo* tras el tratamiento central con leptina.

Incorporación de 2-DOG durante 20 min en *strips* de soleus y EDL, obtenidos de ratas de 3 meses tratadas icv durante 7 días con suero salino o dos dosis de leptina (0,2 y 10 μ g/d). Los *strips* fueron incubados *ex vivo* con insulina (100 nM), leptina (5 nM) o leptina + insulina a las mismas dosis. Los resultados se expresan en nmoles/g de tejido de 2-DOG incorporada, y son la media \pm SEM de 5-6 experimentos independientes, con n=6 ratas por cada condición. * $p < 0,05$ entre los tratamientos indicados

Este último experimento nos permite afirmar que la leptina, a dosis altas, puede ejercer diferentes efectos sobre la acción de insulina en el músculo: señalizando centralmente en el hipotálamo, la leptina reduce la ingesta, el peso corporal y los niveles de glucosa. Estos cambios fisiológicos son acompañados por un aumento de la sensibilidad a la insulina en el músculo, que provoca aumento del transporte de glucosa inducido por insulina. Paralelamente, la acción directa de altas dosis de leptina bloquea parcialmente el transporte de glucosa inducido por insulina.

Discusión

Los resultados presentados en este trabajo de investigación muestran nuevos detalles sobre desarrollo de la resistencia a insulina en la rata Wistar durante el envejecimiento. En él hemos estudiado el desarrollo de dicha resistencia a la insulina en el músculo esquelético y cómo influyen los cambios corporales asociados a la edad en su aparición y desarrollo. La persistencia de resistencia periférica a insulina en el tiempo da lugar a una situación de intolerancia a la glucosa, la cual puede desembocar en el desarrollo de hiperglicemia y diabetes tipo II, patología cuya incidencia aumenta considerablemente en la edad avanzada.

Nuestro grupo de investigación viene usando desde hace años la rata Wistar como modelo experimental de envejecimiento. El uso de modelos experimentales de roedores permite la investigación de enfermedades metabólicas gracias a la homogeneidad de su fondo genético y de las condiciones ambientales (Chen, D et al., 2005). La rata Wistar se ha mostrado como una excelente modelo experimental para el estudio de la resistencia a insulina asociada al envejecimiento, ya que otras estirpes de rata desarrollan hiperinsulinemia a edades avanzadas (Goodman, MN et al., 1983; Barzilai, N et al., 1995) Esta diferencia permite discernir si los cambios observados en la acción de insulina son de carácter primario o simple consecuencia de la hiperinsulinemia. En este caso, la rata Wistar mantiene la normoglucemia y la normoinsulinemia hasta edades avanzadas, lo que permite su uso como modelo fisiológico para el estudio de las alteraciones metabólicas previas a la alteración de la homeostasis de la glucosa.

No obstante, la rata Wistar se caracteriza por un aumento del peso corporal con la edad, asociado a un incremento significativo del nivel de adiposidad visceral que está presente desde los 8 meses de edad y que permanece estable hasta los 24 meses (Escrivá, F et al., 2007; Horrillo D, et al., 2011). Estos cambios corporales van a su vez acompañados de un aumento de los niveles circulantes de leptina y triglicéridos. Sin embargo, este nivel de adiposidad no puede considerarse como obesidad patológica y es muy inferior al observado en otros modelos como la rata *fa/fa* (Zucker, LM et al., 1972) o la WDF (Carrascosa, JM et al., 2001). Con el fin de delimitar los efectos propios del envejecimiento de aquéllos derivados del aumento de la adiposidad visceral, en éste trabajo, como en anteriores, se ha empleado un modelo de RC moderada durante 3 meses en animales de 5 y 21 meses de edad. Este protocolo reduce el índice de adiposidad en las ratas a los 8 y 24 meses hasta niveles similares a los observados en ratas jóvenes, y permite un descenso en la concentración en sangre de leptina, TAG y AG.

El análisis de la sensibilidad global a la insulina mediante el test de tolerancia a insulina pone de manifiesto una reducción significativa de la misma con la edad. Aunque se aprecia un leve incremento de los niveles de glucosa en ayunas con la edad, puede considerarse que la glucemia se mantiene dentro de un rango de normalidad. Además, dicho incremento no va acompañado de cambios significativos en la concentración plasmática de insulina lo que nos

permite afirmar que las ratas viejas estudiadas en este trabajo no presentan alteraciones en el control de la homeostasis de glucosa y se encuentran en un estado fisiológico que puede considerarse como prediabético. La RC moderada provoca una mejora de la sensibilidad a insulina tanto en animales de 8 como de 24 meses. Estos datos confirman estudios previos del grupo en los que se puso de manifiesto el deterioro de la sensibilidad global a insulina utilizando el test de tolerancia a glucosa o la técnica del anclaje euglicémico-hiperinsulinémico (Escrivá, F et al., 2007). Nuestro estudio utilizando el test de tolerancia a insulina revela, sin embargo, una mejora en la sensibilidad a insulina tras la RC en animales de 24 meses, mejora que no se traduce en una mayor tolerancia a glucosa o en el incremento de la captura global de la misma, tal como indicaban los estudios previos mencionados (Escrivá, F et al., 2007) Estos resultados requieren más estudios para explicar esta discrepancia.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación permiten resumir la secuencia temporal de hechos implicados en la aparición de la resistencia a insulina en este modelo de envejecimiento. Los estudios mediante la técnica de *clamp* euglicémico-hiperinsulinémico demostraron que el tejido adiposo es el primer órgano en desarrollar resistencia a insulina a los 8 meses (Escrivá, F et al., 2007). Trabajos paralelos describieron la presencia de resistencia a la acción de insulina en el hipotálamo en animales de 8 meses de edad (García-San Frutos, M et al., 2007). Por el contrario, la disminución de la captura de glucosa en músculo en condiciones de hiperinsulinemia sólo se observa en animales de 24 meses de edad y en músculos mayoritariamente rojos (Escrivá, F et al., 2007). En el presente trabajo se aborda el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia a insulina en músculo esquelético. Dada la complejidad de este tejido, que incluye en su composición diferentes proporciones de distintos tipos de fibras, las cuales difieren a su vez en su metabolismo y en su sensibilidad a la insulina, en este estudio se han analizado los cambios en la acción de insulina en músculo con predominio de fibras de tipo I (soleus) y en músculo mayoritariamente compuesto por fibras de tipo IIa (EDL).

DISCUSIÓN

Un hecho particularmente relevante observado en estudios anteriores es la aparición de resistencia central a la leptina con la edad (Fernández-Galaz, C et al., 2002; Peralta, S et al., 2002) y que es común a otras estirpes de rata (Scarpace, PJ et al., 2001). La acción central de la leptina ha sido propuesta como un factor que induce la sensibilidad periférica a la insulina por lo que la resistencia central a la leptina podría tener como consecuencia un empeoramiento de la respuesta muscular a la insulina. Además, estudios en adipocitos aislados y en otros tipos celulares han puesto de manifiesto que la acción directa de leptina puede inducir una disminución de la respuesta celular a la insulina. Dado que las ratas de 24 meses presentan hiperleptinemia, en este trabajo se ha explorado la posibilidad de que los elevados niveles de leptina circulante con la edad contribuyan al desarrollo o mantenimiento de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético en animales viejos.

A. Acción de insulina sobre el músculo esquelético.

En el presente trabajo se ha estudiado la acción de insulina sobre el músculo esquelético *in vivo* tras la inyección intravenosa de la hormona, analizando los cambios en la fosforilación de proteínas implicadas en la transducción de su señal temprana tales como IR β , IRS-1 y Akt. Adicionalmente, se ha estudiado el efecto de la insulina sobre la captura de glucosa en *strips* de músculo aislados e incubados *ex vivo* con la hormona. La inyección de una dosis suprafisiológica de insulina provoca una fosforilación máxima de las tres proteínas mencionadas tras un período de 5 minutos. Aunque otros autores han utilizado tiempos mayores de estimulación, la fosforilación de estas proteínas en músculo ha sido observada a tiempos cortos en diversos trabajos anteriores (Weigert, C et al., 2005; Dubé, JJ et al., 2011). Nuestros datos revelan que la estimulación de la señal de insulina muestra una mayor persistencia temporal en soleus que en EDL.

El análisis de la fosforilación de IR β , IRS-1 y Akt tras 5 minutos de estimulación *in vivo* con insulina permite observar que está disminuida en las tres proteínas con la edad, lo que indica el desarrollo de resistencia a insulina con el envejecimiento. Esta disminución se observa a los 8 meses de edad en el músculo soleus, mientras que en EDL la reducción de la fosforilación de las tres proteínas analizadas solo es significativa a los 24 meses. Estos resultados son coincidentes con los observados en adipocitos aislados (Molero, JC et al., 2002) y en hipotálamo (García-San Frutos, M et al., 2007) de ratas viejas y reafirman la idea de que la resistencia a insulina durante el envejecimiento es debida a cambios en la estimulación de las proteínas de la zona proximal al receptor de insulina y del receptor mismo. Por otra parte, nuestros resultados demuestran que existe un comportamiento diferencial entre los distintos tipos musculares. Así, el deterioro de la señal insulínica parece tener lugar primeramente en los músculos oxidativos y desarrollarse con posterioridad en los mayoritariamente glucolíticos. De hecho, trabajos previos de nuestro grupo estudiando la estimulación de la señal de insulina en cuádriceps (mayoritariamente glucolítico), no detectaron cambios significativos en la fosforilación de estas proteínas en respuesta a insulina *in vivo* (Serrano, R et al., 2009).

El análisis del transporte de glucosa estimulado por insulina *ex vivo* muestra también una reducción con la edad. El patrón temporal de esta disminución coincide plenamente con el descrito para la señalización intracelular, lo que permite afirmar que la inhibición de la señal de insulina es la causa de la reducción del transporte de glucosa estimulado por esta hormona en ambos tipos musculares durante el envejecimiento. Esta disminución del transporte de glucosa aparece primero en los músculos con un metabolismo más oxidativo y posteriormente en los músculos mayoritariamente glucolíticos.

Varios estudios en pacientes humanos con diabetes tipo II y en modelos de roedores han descrito la reducción de la expresión de algunas proteínas implicadas en la señalización de la insulina, tales como IRS-1 o GLUT-4 (Carlson, CJ et al., 2003). El análisis de la expresión de diversas proteínas

implicadas en la transmisión de la señal de insulina, tales como IR β , IRS-1, Akt o p38, llevado a cabo en este trabajo, no muestra la existencia de alteraciones significativas con la edad ni con la RC. En otro estudio realizado con ratas Fisher 334 X Brown Norway tampoco se observaron cambios con la edad en la expresión de IRS-1 (Sharma, N et al., 2010). Sin embargo, en un estudio previo de nuestro grupo en rata Wistar se observó un descenso en la expresión de IRS-1 en el cuádriceps de animales de 24 meses (Serrano, R et al., 2009) lo que probablemente refleja características específicas de cada tipo muscular. A la vista de estos datos puede postularse que la resistencia a la insulina con la edad está motivada principalmente por defectos en la transmisión de la señal hormonal, si bien no podemos descartar por completo una disminución de la expresión de GLUT-4 que podría contribuir a este fenómeno.

La resistencia a insulina en músculo ha sido relacionada con la acumulación de lípidos intracelulares (Goodpaster, BH et al., 2000) que provoca la presencia excesiva de compuestos derivados de su metabolismo tales como ceramidas y diacilglicerol, cuyo papel en la inducción de resistencia a la insulina ha sido previamente demostrado (Coen, PM et al., 2009). Igualmente, la alteración de la función mitocondrial (Toledo, FGS et al., 2007) y la formación de productos derivados de una oxidación incompleta de los ácidos grasos han sido descritas como responsables de una señalización de insulina deficiente (Koves, TR et al., 2008). La determinación del contenido de lípidos refleja que existe un incremento con la edad en ambos tipos musculares, si bien este incremento es observable en soleus a los 8 meses mientras que en EDL sólo ocurre en animales de 24 meses de edad. Este hecho es compatible con la aparición en primer lugar de un deterioro de la señal de insulina en soleus y más tardíamente en EDL debido a un fenómeno de lipotoxicidad. Los datos de expresión de las enzimas lipogénicas y lipolíticas en animales de distintas edades obtenidos en este trabajo sugieren que existe una mayor captura de ácidos grasos circulantes con la edad, como consecuencia del incremento en la expresión de sus proteínas de transporte, además de un incremento de la capacidad lipogénica y una disminución de la lipolítica. Estos resultados podrían explicar las variaciones observadas en la acumulación de lípidos en el músculo con la edad, así como el menor nivel de ácidos grasos en sangre observado en animales viejos. Es de señalar que el aumento de los transportadores de ácidos grasos en EDL se produce principalmente en animales de 24 meses de edad, coincidiendo con el incremento del nivel de lípidos intracelulares y con la disminución de la señal de insulina en este tejido. Este músculo, debido a su metabolismo mas anaeróbico, está menos capacitado para la oxidación de lípidos en condiciones normales. Sin embargo, en situaciones de mayor adiposidad podría desempeñar un papel, junto con el soleus, como almacén ectópico de lípidos en un intento de contrarrestar el exceso de AG liberados por el tejido adiposo (McQuaid, SE et al., 2011).

La aplicación de RC entre los 5 y los 8 meses de edad, además de reducir la adiposidad a niveles inferiores a la de los 3 meses, provoca un aumento significativo de la sensibilidad del músculo a insulina, que se manifiesta en un incremento de la fosforilación de IR β , IRS-1 y Akt en soleus y de IRS-1

y Akt en EDL. Estos aumentos en la señal de insulina van asociados a una mayor capacidad de transporte de glucosa en respuesta a la hormona. Por otra parte, la RC aplicada en una edad avanzada no produce ninguna mejora en la acción de la insulina, ni a nivel de fosforilación de las proteínas ni a nivel del transporte de glucosa. Estos resultados están en consonancia con lo observado para la sensibilidad global a insulina en respuesta a la RC (Escrivá, F et al., 2007; Carrascosa, JM et al., 2011).

Los cambios en la sensibilidad a insulina producidos por la RC temprana en soleus pueden explicarse parcialmente por la disminución en la cantidad de lípidos intracelulares, que es muy significativa a esa edad. Esta disminución parece ser debida principalmente a la disminución en la expresión de los transportadores implicados en la captura de AG y a una menor capacidad de esterificación de los mismos como se desprende de la menor expresión de DGAT-1. Sin embargo, se observa también una menor actividad lipolítica y un descenso del transporte de AG a la mitocondria para su oxidación. Este hecho puede ser el resultado de una adaptación metabólica al menor almacenamiento de AG. No obstante, el descenso de la oxidación mitocondrial de AG podría evitar la formación de productos parcialmente oxidados implicados en el desarrollo de la resistencia a insulina. La RC tardía también induce una reducción importante de los lípidos acumulados en ambos músculos, principalmente en soleus. No obstante, su nivel permanece por encima del observado en animales de 8 meses de edad lo que podría explicar la falta de efecto sobre la sensibilidad a insulina causada por la RC a edades avanzadas.

Los datos sobre la modificación de la señal de insulina en músculo con la edad difieren de los obtenidos previamente sobre el consumo de glucosa en condiciones de *clamp* euglicémico-hiperinsulinémico en cuanto a su desarrollo temporal (Escrivá, F et al., 2007). Así, mientras que la señal de insulina en soleus parece estar disminuida ya a los 8 meses de edad, la disminución de la captura de glucosa sólo se observaba en animales viejos en los estudios previos. Estos resultados parecen sugerir que la inhibición de la señal de insulina comienza a los 8 meses pero no tiene repercusión efectiva sobre el consumo de glucosa *in vivo* hasta que no se alcanza un nivel de inhibición mayor tal como ocurre en los animales viejos. En dichos estudios se analizó el músculo cuadriceps como ejemplo de músculo glucolítico para el cual no se observó una disminución significativa de la captura de glucosa, lo cual coincide con la ausencia de inhibición de la señal de insulina en dicho músculo en animales viejos (Serrano, R et al., 2009). Respecto al EDL, un músculo mayoritariamente glucolítico también, de acuerdo a los resultados de este trabajo sabemos que experimenta una inhibición de la señal de insulina en animales de 24 meses de edad pero desconocemos si ello repercute en una disminución en la captura de glucosa en condiciones de *clamp* euglicémico-hiperinsulinémico.

Estos resultados en su conjunto confirman datos previos de nuestro grupo postulan que la reducción de la sensibilidad a insulina en la rata Wistar está relacionada con el incremento en la adiposidad asociada al envejecimiento (Serrano, R et al., 2009; Carrascosa, JM et al., 2011). No obstante, a edades

avanzadas la disminución de la adiposidad no permite la recuperación de la sensibilidad a insulina, lo que sugiere la presencia de otros factores responsables de su persistencia en el tiempo. Además, estos resultados coinciden con los observados en trabajos en humanos (Karakelides, H et al., 2009; Kaakelides H, Irving, BA et al. Diabetes 2010).

B. Acción directa de la leptina sobre el músculo esquelético.

La leptina, además de su acción central en el hipotálamo, actúa directamente sobre múltiples tejidos que expresan los OB-R. La descripción de la expresión de receptores de leptina en el músculo y los efectos de la misma sobre líneas celulares y músculos aislados, sugieren que la leptina circulante puede tener un efecto sobre el tejido muscular (Minokoshi, Y et al., 2002; Fuentes, T et al., 2010). Dicho efecto podría ser especialmente relevante en el proceso de envejecimiento durante el cual se produce un aumento muy significativo de la concentración de leptina en sangre. En este trabajo se ha comprobado que tanto soleus como EDL expresan la isoforma Ob-Rb, mientras que la isoforma corta Ob-Ra solo es detectable en el soleus. Trabajos que han descrito la presencia de receptores de leptina en el músculo esquelético no hacen distinción entre tipos de fibras musculares (Akasaka, Y et al., 2010). Es posible que la expresión del Ob-Ra sea muy reducida en algunos tipos musculares, como en el caso del EDL. La expresión de las principales isoformas del Ob-R muestra una tendencia al descenso durante el envejecimiento y una recuperación de su expresión en ambos grupos de edad sometidos a RC. Por el contrario, la expresión de SOCS-3 muestra una tendencia a aumentar con la edad, sobre todo en EDL, lo que coincide con un aumento significativo de la presencia de SOCS-3 en ambos músculos a los 24 meses de edad. SOCS-3 actúa como un modulador negativo de la señal de leptina, impidiendo y/o terminando la transducción de la señal (Bjorbaek, C, 2000). Los cambios en la expresión de SOCS-3 y Ob-R parecen indicar que existe un descenso de la acción de leptina en el músculo con la edad. Trabajos previos de nuestro grupo caracterizaron la presencia de resistencia a leptina en el hipotálamo de ratas viejas debido al aumento de la expresión de SOCS-3 y la disminución del Ob-Rb (Peralta, S et al., 2002). Por otra parte, varios trabajos han descrito el descenso de la acción de leptina en el músculo en modelos de obesidad inducida mediante dieta grasa en rata y ratón (Liu, Y et al., 2006; Martin, TL et al., 2006).

DISCUSIÓN

La leptina utiliza diversas vías de señalización intracelular para ejercer sus efectos. En el presente estudio se ha analizado el efecto de leptina sobre la fosforilación de AMPK α y de IRS-1, y sobre la estimulación del transporte de glucosa, en ambos tipos musculares, y las alteraciones debidas al envejecimiento y la restricción calórica. Nuestros datos revelan que la leptina *in vivo* estimula la fosforilación a tiempos cortos de AMPK α , tanto en soleus como en EDL. Esta estimulación disminuye con la edad, observándose en soleus a los 8 meses y en EDL en animales de 24 meses. La RC sólo induce la mejora de la estimulación por leptina en soleus y en animales de 8 meses de edad. La activación de AMPK α conlleva la fosforilación de la ACC, lo que inhibe su actividad y reduce la concentración de malonil-CoA, lo que favorece

a su vez la acción de CPT-1b, enzima limitante del transporte de aciles-CoA a la mitocondria. De esta forma la leptina promueve la oxidación mitocondrial de AG (Long, YC et al., 2006; Steinberg, GR et al., 2009). Por consiguiente, la disminución con la edad de la estimulación de AMPK α por la acción directa de leptina *in vivo* puede explicar la acumulación intracelular de lípidos en el músculo observada en este trabajo. Conviene señalar que los animales de 24 meses de edad también presentan resistencia central a la leptina (Scarpace, PJ et al., 2000; Fernández-Galaz, C et al., 2002), lo que contribuiría a reforzar la acumulación intracelular de lípidos en el músculo (Minokoshi, Y et al., 2002). A la vista de estos datos puede postularse que la disminución de la acción directa de la leptina sobre el músculo es parcialmente responsable del desarrollo de la resistencia a insulina muscular con la edad.

La acción de leptina sobre el músculo estimula la fosforilación en tirosina de IRS-1, de forma independiente de la insulina, probablemente a través de la interacción de Jak2 con IRS-1 (Frühbeck, G, 2006). Este efecto sobre la fosforilación de IRS-1 es siempre inferior al inducido por insulina en las mismas condiciones. Los datos de este trabajo revelan que este efecto también disminuye con la edad en los dos músculos analizados siendo prácticamente inexistente en ratas de 24 meses de edad.

Por último, nuestros datos demuestran que la leptina actuando sobre músculos aislados es capaz de estimular el transporte de glucosa de forma independiente de insulina. Este resultado fue anteriormente descrito en modelos experimentales similares (Ceddia, RB et al., 1999a; Yaspelkis, BB et al., 1999). Este efecto, al igual que la estimulación de la fosforilación de IRS-1, es menor que el producido por insulina. El análisis de este efecto en los grupos de envejecimiento muestra un descenso de esta estimulación con la edad similar al mostrado en la fosforilación de AMPK α y una recuperación tras a RC temprana exclusivamente en soleus.

La pérdida de la capacidad de la leptina de estimular la fosforilación de AMPK α e IRS-1 y de estimular el transporte de glucosa en músculos de ratas de edad avanzada nos permite postular que existe una resistencia a la acción directa de leptina en el músculo con el envejecimiento. Esta resistencia a leptina puede estar causada por el aumento de la expresión de SOCS-3 en el músculo, sumado al descenso de la expresión de los mRNA del Ob-R, lo que coincidiría con el mecanismo propuesto anteriormente para la resistencia a leptina en el hipotálamo (Peralta, S et al., 2002). Sin embargo, en el músculo soleus la reducción de la acción de la leptina en la fosforilación de AMPK α y en la estimulación del transporte de glucosa ya es apreciable a los 8 meses de edad, cuando todavía no se observa un aumento de SOCS-3. Esto sugiere que otros factores, aparte del incremento de la expresión de SOCS-3, pueden estar implicados en provocar un descenso de la acción de la leptina. Uno de ellos podría ser la pérdida de la actividad de AMPK α con la edad, aunque son necesarios más estudios para explorar esta posibilidad (Qiang, W et al., 2007)

La capacidad de leptina de estimular la fosforilación de IRS-1 y el transporte de glucosa sugiere la existencia de una relación causal entre estos dos efectos de un modo independiente a la acción de insulina (Fujii, N et al., 2006). Sin embargo, el aumento de la fosforilación en tirosina de IRS-1 no se traduce en un aumento de la fosforilación de Akt. Esto sugiere que deben existir diferencias en los residuos de tirosina fosforilados en IRS-1 en respuesta a cada hormona o que existe una distribución espacial diferencial de las moléculas de IRS-1 que se asocian al $IR\beta$ o al complejo Ob-Rb/Jak2 que impide el acceso de estas últimas a la estimulación de Akt. En cualquier caso, estos datos sugieren que la estimulación del transporte de glucosa por leptina es independiente de la actuación del eje IRS-1/Akt.

Otro posible mecanismo para la estimulación por leptina del transporte de glucosa implica la activación de AMPK. Existen múltiples trabajos que demuestran que la contracción mecánica del músculo produce la exocitosis de GLUT-4 de forma independiente a la señalización de insulina (Tremblay, F et al., 2003). Un modelo propuesto asocia la activación de AMPK por el ejercicio, producido por el descenso de los niveles de ATP celulares, con la fosforilación de AS160 (Treebak, JT et al., 2006; Cartee, GD et al., 2007). Esto permitiría la exocitosis de GLUT-4 de forma independiente a la fosforilación de Akt. Nuestros resultados parecen sugerir que el efecto de la acción directa de leptina en la estimulación del transporte de glucosa podría estar mediado por la activación secuencial de $AMPK\alpha$ y AS160, ya que el descenso de la fosforilación de $AMPK\alpha$ a los 8 meses de edad en soleus coincide con el descenso del transporte de glucosa estimulado por leptina.

Si se compara la acción directa de leptina sobre los dos tipos de músculos analizados se observa cómo el soleus se muestra más sensible a su acción, con un nivel de fosforilación de $AMPK\alpha$ más elevado y mayor cantidad de glucosa incorporada que el EDL. Estos resultados son coherentes con los primeros trabajos que estudiaron el efecto de leptina sobre el músculo esquelético (Minokoshi, Y et al., 2002), si bien estudios posteriores afirman que el EDL muestra una mayor sensibilidad a la acción *ex vivo* de leptina (Janovská, A et al., 2008).

En conjunto, estos resultados permiten afirmar que la leptina, actuando directamente sobre el músculo esquelético, estimula la fosforilación de AMPK y de IRS-1 y induce el transporte de glucosa de forma independiente de la insulina, proceso en el cual podría estar implicada en la activación de $AMPK\alpha$. Igualmente puede afirmarse que el músculo esquelético desarrolla resistencia periférica a la leptina a partir de los 8 meses de edad en el soleus y a los 24 meses de edad en el EDL. La resistencia a leptina en el músculo soleus puede revertirse mediante RC temprana, pero la RC tardía es ineficaz en este sentido, al igual que ocurre con su efecto sobre la sensibilidad a insulina.

C. Efecto de altas dosis de leptina sobre la acción de insulina en el músculo esquelético.

Como se ha señalado anteriormente, el envejecimiento está asociado a un incremento de la adiposidad visceral y a la presencia en sangre de concentraciones elevadas de leptina, lo que parece ser una respuesta al desarrollo de resistencia central a la leptina. Esta situación podría ser especialmente favorable para que la acción directa de leptina sobre los tejidos periféricos predominara sobre sus efectos centrales. Aunque la acción central de leptina sobre el músculo induce un efecto sensibilizador a la insulina, poco se sabe sobre sus efectos directos. En este trabajo se ha explorado si, de un modo similar a lo observado en tejido adiposo (Pérez, C et al., 2004), la acción directa de leptina sobre el músculo puede causar la inhibición de la acción insulínica y ser, en parte, responsable del desarrollo de resistencia a insulina durante el envejecimiento.

Los datos mostrados en este trabajo indican que la acción de insulina sobre el músculo esquelético se ve alterada tras un tratamiento previo con dosis altas de leptina. Estos resultados confirman lo encontrado en trabajos publicados anteriormente utilizando modelos *in vitro* (Sweeney, G et al., 2001). Sin embargo, otros autores encontraron que la incubación con leptina de células de origen muscular L6 no altera el transporte de glucosa estimulado por insulina (Fürnsinn, C et al., 1998; Ranganathan, S et al., 1998). Estas diferencias podrían deberse a los diferentes tiempos de tratamiento con leptina empleados, o al uso de diferentes modelos experimentales. En nuestro estudio, utilizando condiciones *in vivo* que propician la acción directa de leptina sobre el músculo, y tratamientos *ex vivo* que garantizan la observación de una acción directa exclusivamente, hemos observado que el pretratamiento con leptina inhibe por una lado la activación por insulina de su señal temprana (fosforilación de IR β y Akt) en soleus, y además disminuye los efectos de la hormona sobre el transporte de glucosa. En EDL de ratas de 3 meses de edad sólo se observa un ligero descenso del efecto de insulina sobre la fosforilación de IR β tras el tratamiento con leptina, no observándose cambios en la fosforilación de Akt. Sin embargo, el transporte de glucosa si está afectado por el tratamiento previo con leptina lo que plantea la existencia de algún mecanismo diferencial entre los dos tipos musculares. Es de señalar que la acción de leptina sobre la fosforilación de IR β estimulada por insulina en EDL en el grupo 8-RC no se observa, lo que está de acuerdo con la falta de recuperación de la sensibilidad a leptina en este músculo tras la RC temprana, descrita anteriormente.

Este efecto de la leptina se observa exclusivamente en los grupos experimentales en los que el músculo esquelético se muestra más sensible a la acción de insulina. Así, sólo observamos alteraciones significativas en la acción de la insulina en músculos de ratas de 3 meses de edad y en músculos de animales de 8 meses sometidos a RC. En el resto de los grupos no existen diferencias entre la acción de insulina con y sin pretratamiento con leptina probablemente debido al hecho de que la acción de insulina en dicho grupos se encuentra ya disminuida. Ese fenómeno también se observa en relación a la acción directa de leptina sobre adipocitos aislados de ratas de 24 meses (Pérez, C et al., 2004).

Respecto al mecanismo molecular responsable de ese efecto de leptina sobre la acción de insulina existen trabajos con modelos celulares en los que se describe la interacción de SOCS-3 con IR, la cual podría constituir un mecanismo inhibitorio de la fosforilación del receptor de insulina (Eguchi, M et al., 2007). Sin embargo, los músculos tratados con leptina *in vivo* durante 20 minutos no mostraron un aumento de SOCS-3, por lo que resulta poco probable que éste sea el mecanismo implicado. No obstante, en animales de 24 meses de edad sometidos a una hiperleptinemia crónica durante el envejecimiento si se observan niveles elevados de SOCS-3, por lo que este mecanismo aunque no explica los efectos a corto plazo de leptina, si podría estar implicado en el mantenimiento de la resistencia a insulina en músculo a edades avanzadas, de un modo similar a lo observado previamente en tejido adiposo (Pérez, C et al., 2004).

Otra posibilidad recae en la activación de proteínas con actividad fosfatasa, que desfosforilasen los residuos de tirosina de IR β . La fosfatasa PTP-1B es conocida como un regulador negativo de la señalización de insulina por desfosforilación de IR β y de IRS-1 (González-Rodríguez, A et al., 2010). Recientemente se ha descrito una nueva fosfatasa citosólica que podría estar modulando el nivel de fosforilación de IR β e IRS-1 y disminuyendo la acción de insulina en músculo esquelético, la PTP ϵ (Aga-Mizrachi, S et al., 2007). Con los datos disponibles no es posible establecer su implicación en este efecto de leptina, lo cual requerirá nuevos estudios.

Mención aparte merece el comportamiento de la fosforilación de IRS-1 tras el pretratamiento con leptina. Al contrario de lo observado para IR β y Akt, la leptina induce un incremento de la fosforilación de IRS-1 en respuesta a insulina, incremento que se observa en los dos músculos estudiados aunque sólo alcanza significatividad estadística en soleus. Otros trabajos han demostrado la interacción de SOCS-3 con IRS-1 en músculos de ratas alimentadas con dietas ricas en grasa (Yaspelkis, BB, 3rd et al., 2009), sugiriendo que este mecanismo participa en el desarrollo de la resistencia a insulina en músculo por inducción de la degradación mediada por ubiquitinación de IRS-1 (Rui, L et al., 2002). Sin embargo, nuestros resultados no parecen apoyar estas hipótesis dado que el efecto del pretratamiento con leptina aumenta la fosforilación en tirosina de IRS-1 en vez de reducirla. La fosforilación observada en animales de 3 meses parece ser el resultado aditivo de los respectivos efectos de leptina e insulina individualmente considerados, mientras que en animales de 8 meses sometidos a restricción nutricional se produce un incremento de la fosforilación de IRS-1 superior al mero efecto aditivo. Con los datos disponibles resulta difícil explicar el efecto de leptina sobre la fosforilación de IRS-1 en respuesta a insulina. Dicha fosforilación no refleja el nivel de activación de IR β ni mantiene una relación directa con el nivel de fosforilación de Akt.

Estos hechos sugieren que no todas las moléculas de IRS-1 están implicadas en la transducción de la señal de insulina hasta Akt, aunque no es posible determinar si entre aquéllas que lo están se produce una disminución de la fosforilación en tirosina como resultado del pretratamiento con leptina. Puede especularse con la existencia de una compartimentación de las moléculas de IRS-1 en entornos próximos a los receptores de leptina e insulina

respectivamente, siendo estas últimas las únicas que transmitirían su señal hasta Akt. Este hecho no excluye que la leptina, mediante la activación de alguna de sus vías de señalización no tenga acceso a la inhibición de la señal de insulina a nivel de su receptor.

En conjunto, estos resultados muestran como la presencia de una dosis alta de leptina actuando sobre el músculo esquelético puede alterar la correcta acción de insulina sobre este tejido, produciendo cambios en la señalización intracelular y en el transporte de glucosa inducido por insulina.

D. Papel de p38 en el efecto de leptina sobre la estimulación por insulina del transporte de glucosa.

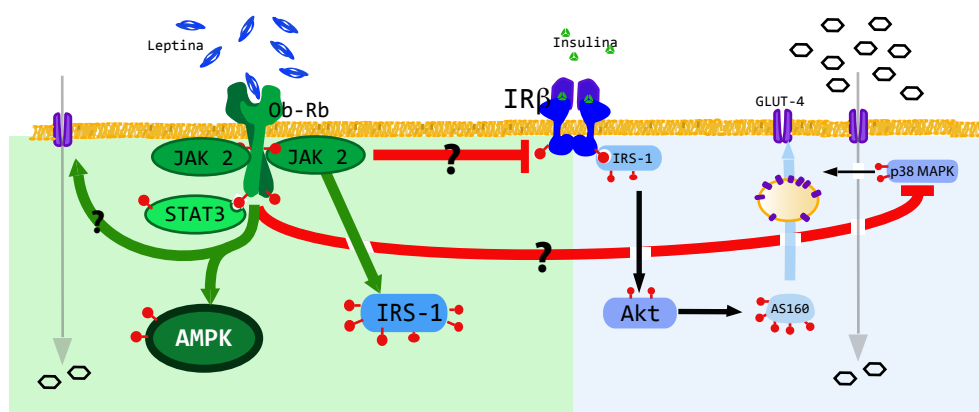
Varios grupos de investigación han demostrado que la acción de insulina sobre el músculo esquelético está asociada a la activación de p38 (Somwar, R et al., 2000; Macko, AR et al., 2008). Esta proteína, del tipo MAPK, responde a diferentes señales de *stress* celular, aunque se desconoce cuál es el mecanismo celular que produce su activación tras la unión de la insulina a su receptor. Por otro lado, se ha descrito su participación en el proceso de captura de glucosa inducida por insulina a través de GLUT4, en el que su estimulación es necesaria para la correcta activación de GLUT-4, aunque no para la translocación del transportador a la membrana plasmática. (Somwar, R et al., 2001a). De esta forma se postuló que el mecanismo de excitosis de GLUT4 constaría de dos procesos que requerirían la regulación temporal de dos vías de señalización diferentes. Independientemente del papel de p38 en la estimulación del transporte de glucosa por insulina, los resultados de este trabajo revelan que el tratamiento *in vivo* promueve la fosforilación de p38. Este efecto está presente en ambos músculos y en ambos se observa un descenso significativo de su fosforilación en respuesta a insulina a los 24 meses de edad.

Los datos de este estudio ponen de manifiesto que el tratamiento *in vivo* con leptina produce una disminución de la fosforilación de p38 por debajo del nivel basal presente en los músculos de rata Wistar. Este resultado es opuesto al descrito para células humanas mononucleares en las que el tratamiento con leptina aumenta de la fosforilación de p38 (van den Brink, GR et al., 2000). Apenas existen trabajos que describan el efecto de leptina sobre p38. Algunos autores han descrito una posible relación indirecta entre leptina y p38 a través de AMPK, sugiriendo que p38 estaría situada en un nivel inferior al de AMPK y siendo regulada de forma indirecta por la activación de esta última (Xi, X et al., 2001; Lemieux, K et al., 2003; Jing, M et al., 2008). No obstante otros trabajos han cuestionado esta posibilidad (Ho, RC et al., 2007).

La inhibición por leptina de p38 descrita en este estudio no se ve modificada por el envejecimiento o la RC. Este hecho es contradictorio con los cambios observados en la acción de leptina. Cabe la posibilidad de que la inhibición de p38 sea especialmente sensible a leptina, siendo suficiente un nivel mínimo de señal para mantener la inhibición.

Independientemente de los efectos sobre p38 causados por insulina y leptina, una observación realmente novedosa de este estudio es la constatación de que el pretratamiento con altas dosis de leptina bloquea la estimulación por insulina de la fosforilación de p38 tanto en soleus como en EDL. Al igual que lo observado en los efectos sobre la señal de insulina y el transporte de glucosa, el efecto inhibitorio de leptina sobre la estimulación de p38 por insulina sólo se aprecia en los grupos que presentan mayor sensibilidad a la insulina, 3-AL y 8-RC. La falta de efecto en los otros grupos debe ser consecuencia de la escasa señal de insulina en los mismos ya que el efecto inhibitorio de leptina no parece decrecer con la edad.

La inhibición de la fosforilación de p38 por leptina tiene lugar, tanto en soleus como en EDL, en los que el transporte de glucosa inducido por insulina esta significativamente disminuido a causa del pretratamiento con leptina. Este resultado sugiere que la leptina podría modificar el transporte de glucosa estimulado por insulina principalmente mediante la inhibición de la fosforilación de p38. Este efecto sería complementario a la reducción de la fosforilación estimulada por insulina de IR β y Akt.



Modelo 1. Mecanismo celular propuesto para el efecto del pretratamiento con leptina sobre la acción de insulina en el músculo esquelético.

La acción directa de leptina, mediante dos mecanismos celulares desconocidos por el momento, inhibe la fosforilación de IR β y p38 estimulada por insulina. Esto provoca un descenso de la señalización de insulina y una inhibición del transporte de glucosa estimulado por esta hormona.

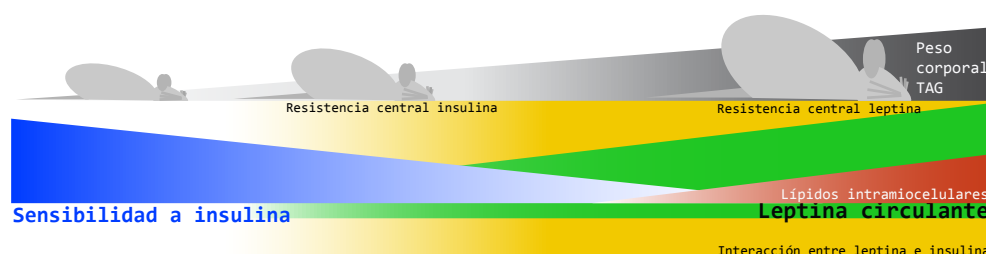
Los datos de este trabajo demuestran además que la inhibición de p38 mediante inhibidores específicos inhibe el transporte de glucosa estimulado por insulina en ambos músculos, de acuerdo a datos previamente publicados (Somwar, R et al., 2000; Somwar R, Perreault M. Diabetes 2000). Esta inhibición ha sido comprobada utilizando no sólo el inhibidor SB208035, cuya especificidad para inhibir p38 ha sido cuestionada (Antonescu, CN et al., 2005; Bazuine, M et al., 2005), sino también empleando otro inhibidor más específico, el BIRB796

En conjunto, estos resultados soportan la hipótesis de que dosis elevadas de leptina inhiben la acción de insulina en músculo, disminuyendo su señalización temprana así como la fosforilación de p38. Estos defectos en la acción de insulina se traducen en un descenso de la capacidad de la misma para inducir el transporte de glucosa en el músculo esquelético. La suma de estos efectos inhibitorios sobre la acción de insulina puede estar favoreciendo el desarrollo de la resistencia a insulina en este tejido con la edad.

E. Comparación de los efectos centrales y periféricos de altas dosis de leptina sobre la sensibilidad a insulina del músculo esquelético en ratas de 3 meses de edad.

En múltiples modelos experimentales se ha demostrado que la leptina, actuando a través de sus receptores en el hipotálamo, tiene una función sensibilizadora frente a la insulina en el músculo esquelético (Yaspelkis, BB et al., 1999; Dube, JJ et al., 2007; Roman, EA et al., 2009). Por otro lado, trabajos previos de nuestro grupo y otros han puesto de manifiesto que la leptina inhibe la acción de insulina en tejido adiposo actuando tanto centralmente como de un modo directo sobre el mismo (Muller, G et al., 1997; Ceddia, RB et al., 1998b; Pérez, C et al., 2004; Bonzón-Kulichenko, E et al., 2011). Puesto que el envejecimiento se asocia al desarrollo de resistencia central a leptina, puede postularse que la pérdida de su efecto sensibilizador podría ser parcialmente responsable de la aparición tardía de la resistencia a insulina en músculo. Sin embargo, los datos de este trabajo sugieren que la aparición de hiperleptinemia podría también contribuir a la pérdida de sensibilidad a la insulina por parte del músculo. Con objeto de comprobar en un mismo animal la existencia de este doble efecto de leptina, procedimos a la implantación icv de minibombas osmóticas cargadas con solución salina o con leptina, y analizamos posteriormente *ex vivo* la capacidad de la insulina de estimular la captura de glucosa en músculo. Nuestros datos muestran claramente que la leptina, a una dosis de 10 µg/día durante 7 días, reduce la ingesta y el peso corporal de los animales así tratados en relación a aquéllos que fueron infundidos con solución salina, en consonancia con datos propios y de otros grupos de investigación (Gallardo, N et al., 2007; Pal, R et al., 2003; Berthou, F et al., 2011). Estos animales manifiestan un aumento de la sensibilidad a la insulina tanto global como en músculo que se refleja, por un lado, en la disminución significativa de la glucosa en sangre tras el ayuno nocturno, y por otro lado en la mayor captura de glucosa en respuesta a insulina en el músculo soleus si se compara con la estimulación observada en músculos procedentes de ratas infundidas con solución salina. Este efecto no se observó en EDL. Habida cuenta de que la mejora en la sensibilidad a insulina inducida por la leptina central está muy probablemente relacionada con su capacidad para estimular la oxidación muscular de ácidos grasos, las diferencias observadas entre soleus y EDL pueden explicarse por la disponibilidad de un contenido menor de AG en este último.

En contraste con los datos obtenidos tras el tratamiento central con leptina, la preincubación *ex vivo* con altas dosis de leptina anteriormente a la estimulación con insulina tiene como consecuencia la inhibición de la capacidad de insulina para estimular el transporte de glucosa. Este efecto se observa también si los músculos proceden de animales tratados centralmente con solución salina. Hay que señalar que todos estos cambios inducidos por el tratamiento directo con leptina ocurren exclusivamente en soleus mientras que el EDL se muestra una vez más insensible a la presencia de elevados niveles de leptina. Estas diferencias pueden basarse en el hecho de que EDL muestra de por sí una menor respuesta a la insulina así como a la leptina, tal como se ha comentado anteriormente.



Modelo 2. Esquema de la interacción de leptina e insulina en el músculo esquelético durante el envejecimiento.

Durante el envejecimiento, el músculo esquelético sufre un descenso de su sensibilidad a insulina. Este desarrollo de la resistencia a insulina puede estar provocado, al menos parcialmente, por los altos niveles de leptina circulante a partir de los 8 meses de edad (zona de interacción entre las hormonas, color naranja). Los niveles de leptina aumentan con la edad, posiblemente debido al incremento de la adiposidad y el posterior desarrollo de resistencia central a leptina. A partir de esta edad el músculo desarrolla también resistencia periférica a la leptina, y comienza a almacenar mayor cantidad de lípidos. Esto puede conllevar un proceso de lipotoxicidad que favorecerá el desarrollo de la resistencia a insulina en el músculo esquelético.

En resumen, los resultados de este trabajo demuestran que el músculo esquelético oxidativo presenta una respuesta diferenciada frente a los efectos de leptina dependiendo de si ésta actúa a través del SNC o de un modo directo sobre el tejido muscular. En el primer caso la leptina se comporta como una hormona que sensibiliza al músculo frente a la insulina mientras que en el segundo caso se manifiesta como un factor que contribuye a inhibir la acción insulínica. Dado que el proceso de envejecimiento va asociado a la presencia progresiva de resistencia central a la leptina e hiperleptinemia, puede postularse que en animales viejos los efectos directos deben prevalecer sobre la acción central de leptina y contribuir al desarrollo de la resistencia muscular a la insulina. Una cuestión que permanece por esclarecer es el mecanismo molecular de esta interacción negativa entre la acción de leptina e insulina. Con los datos disponibles puede afirmarse que la inhibición de p38 causada por la leptina puede contribuir a disminuir el transporte de glucosa estimulado por insulina. Este efecto de leptina persiste en animales de 24 meses de edad por lo que puede postularse que contribuye al mantenimiento del estado de resistencia a esta edad. Queda, no obstante, por esclarecer, el mecanismo molecular implicado en la inhibición de la señal temprana de la insulina. Los datos de este trabajo parecen descartar la implicación de SOCS-3 en los efectos agudos analizados. Aun así, y dado que el nivel de SOCS-3 está incrementado en animales viejos, no puede descartarse que su incremento no esté desempeñando un papel inhibitorio de la señal insulínica en edades avanzadas. Finalmente, la pérdida de acción de leptina con la edad hace difícil pensar cómo podría estar funcionando este mecanismo de inhibición de la señal de insulina a edades avanzadas. Es probable que este efecto de la leptina sea un efecto inicial desencadenante de la resistencia. A medida que su acción disminuya, la falta de activación de AMPK y de la oxidación de AG podría ser el factor principal en el mantenimiento de la resistencia a insulina junto con la pérdida de los efectos centrales de la leptina.

Conclusiones

- 1** La acción de insulina sobre el músculo esquelético disminuye con el envejecimiento en la rata Wistar. Esta disminución se observa a los 8 meses en fibras musculares de tipo I (soleus) y a los 24 meses en fibras de tipo IIa (EDL). El descenso en la acción de insulina se ve reflejado en la reducción de la fosforilación *in vivo* de las principales proteínas de la vía temprana de señalización de la insulina, así como de la capacidad de estimular el transporte de glucosa. La RC iniciada a edades tempranas es capaz de revertir la resistencia a insulina en el músculo. Sin embargo la RC tardía carece de efecto sobre la sensibilidad muscular a la insulina.
- 2** Las fibras musculares de tipo I son más sensibles a la acción de la insulina que las fibras de tipo IIa y presentan mayor capacidad para almacenar lípidos intracelulares. Existe una correlación entre los cambios en la presencia de lípidos en el músculo con la edad y la restricción calórica, y las variaciones en la sensibilidad a insulina.
- 3** El músculo esquelético desarrolla resistencia a la acción directa de la leptina con la edad. Dicha resistencia se manifiesta en una menor estimulación de la fosforilación de AMPK e IRS-1, así como del transporte de glucosa, en presencia de leptina. Esta resistencia se observa primeramente en músculos oxidativos y más tardíamente en los glucolíticos. A los 24 meses de edad ambos tipos musculares muestran un incremento en la expresión de SOCS-3.
- 4** La acción directa de leptina *in vivo* inhibe la señal temprana de insulina en el músculo esquelético oxidativo de animales con alta sensibilidad a insulina. Igualmente, el tratamiento *ex vivo* con leptina disminuye el efecto estimulador de la insulina sobre el transporte de glucosa en el músculo esquelético.
- 5** La insulina estimula la fosforilación de p38, estimulación que disminuye con la edad. Por su parte, la leptina inhibe la fosforilación de p38, efecto que se conserva a edades avanzadas. El pretratamiento con leptina bloquea la estimulación de p38 por insulina. Además, el bloqueo de p38 mediante el uso de inhibidores específicos disminuye el efecto de insulina sobre el transporte de glucosa en músculo. Estos datos permiten postular que el efecto inhibitorio de leptina sobre la estimulación del transporte de glucosa por insulina se debe, al menos parcialmente, a su capacidad para inhibir la fosforilación de p38 estimulada por insulina.
- 6** El tratamiento central con altas dosis de leptina induce la sensibilización del músculo soleus a insulina, lo que se manifiesta en un incremento de la capacidad de la insulina para estimular el transporte de glucosa *ex vivo*. Por el contrario, el tratamiento *ex vivo* con altas dosis de leptina de músculos procedentes de animales estimulados *icv* con leptina, hace disminuir la capacidad sensibilizadora de la leptina central frente a la insulina. Estos datos permiten afirmar que la leptina modula de forma opuesta la acción de insulina en músculo en función de su actuación a nivel central o de un modo directo sobre el propio músculo.

CONCLUSIÓN FINAL

Los datos de este trabajo ponen de manifiesto que el músculo esquelético de la rata Wistar desarrolla resistencia a insulina y a leptina con el envejecimiento. Por otro lado, estos resultados revelan que la estimulación con altas dosis de leptina inhibe la acción de insulina en músculo tanto *in vivo* como *ex vivo*. Esta inhibición debe estar basada en, al menos, dos mecanismos moleculares diferentes, uno que afecta a la estimulación de la señal temprana de insulina, y otro implicado en la activación del transportador de glucosa GLUT4 y que está mediado por la acción sobre la p38. Este efecto de leptina tiene lugar mediante su acción de un modo directo sobre el músculo e independientemente de sus efectos centrales. Dado que la rata Wistar presenta hiperleptinemia a edades avanzadas así como resistencia central a leptina, cabe postular que el efecto aquí descrito puede resultar de capital importancia en el desarrollo y/o mantenimiento de la resistencia a insulina con la edad.

Bibliografía

- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA (2010) Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:1-20.
- Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ (2001) Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291:2613-2616.
- Aga-Mizrachi S, Brutman-Barazani T, Jacob AI, Bak A, Elson A, Sampson SR (2007) Cytosolic Protein Tyrosine Phosphatase- Is a Negative Regulator of Insulin Signaling in Skeletal Muscle. *Endocrinology* 149:605-614.
- Ai J, Wang N, Yang M, Du Z-M, Zhang Y-C, Yang B-F (2005) Development of Wistar rat model of insulin resistance. *World J Gastroenterol* 11:3675-3679.
- Akasaka Y, Tsunoda M, Ogata T, Ide T, Murakami K (2010) Direct evidence for leptin-induced lipid oxidation independent of long-form leptin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1801:1115-1122.
- Antonescu CN, Huang C, Niu W, Liu Z, Eysers PA, Heidenreich KA, Bilan PJ, Klip A (2005) Reduction of insulin-stimulated glucose uptake in L6 myotubes by the protein kinase inhibitor SB203580 is independent of p38MAPK activity. *Endocrinology* 146:3773-3781.
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11:191-198.
- Barazzoni R (2005) Moderate Caloric Restriction, But Not Physiological Hyperleptinemia Per Se, Enhances Mitochondrial Oxidative Capacity in Rat Liver and Skeletal Muscle--Tissue-Specific Impact on Tissue Triglyceride Content and AKT Activation. *Endocrinology* 146:2098-2106.
- Barbieri M, Rizzo MR, Manzella D, Paolisso G (2001) Age-related insulin resistance: is it an obligatory finding? The lesson from healthy centenarians. *Diabetes Metab Res Rev* 17:19-26.
- Barnard RJ, Edgerton VR, Furukawa T, Peter JB (1971) Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am J Physiol* 220:410-414.
- Bartness TJ, Shrestha YB, Vaughan CH, Schwartz GJ, Song CK (2010) Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 318:34-43.
- Barzilai N, Rossetti L (1995) Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. *Am J Physiol* 269:E591-597.
- Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, Chen W, Rossetti L (1998) Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J Clin Invest* 101:1353-1361.
- Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L (1997) Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest* 100:3105-3110.
- Basu R, Breda E, Oberg AL, Powell CC, Dalla Man C, Basu A, Vittone JL, Klee GG, Arora P, Jensen MD, Toffolo G, Cobelli C, Rizza RA (2003) Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes* 52:1738-1748.
- Bates SH, Myers MG, Jr. (2003) The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 14:447-452.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- Bazuine M, Carlotti F, Rabelink MJWE, Vellinga J, Hoeben RC, Maassen JA (2005) The p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 reduces glucose turnover by the glucose transporter-4 of 3T3-L1 adipocytes in the

- insulin-stimulated state. *Endocrinology* 146:1818-1824.
- Belgardt BF, Bruning JC (2010) CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 1212:97-113.
- Bernard JR, Reeder DW, Herr HJ, Rivas DA, Yaspelkis BB (2006) High-fat feeding effects on components of the CAP/Cbl signaling cascade in Sprague-Dawley rat skeletal muscle. *Metab Clin Exp* 55:203-212.
- Berthou F, Rouch C, Gertler A, Gerozissis K, Taouis M (2011) Chronic central leptin infusion differently modulates brain and liver insulin signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Berti L, Gammeltoft S (1999) Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2. *Molecular and Cellular Endocrinology* 157:121-130.
- Berti L, Kellerer M, Capp E, Häring HU (1997) Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia* 40:606-609.
- Bjorbaek C, Kahn BB (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59:305-331.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS (1998) Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1:619-625.
- Bjorbaek C (2000) SOCS3 Mediates Feedback Inhibition of the Leptin Receptor via Tyr985. *Journal of Biological Chemistry* 275:40649-40657.
- Bonen A, Luiken JJ, Liu S, Dyck DJ, Kiens B, Kristiansen S, Turcotte LP, Van Der Vusse GJ, Glatz JF (1998) Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *Am J Physiol* 275:E471-478.
- Bonzón-Kulichenko E, Fernández-Agulló T, Moltó E, Serrano R, Fernández A, Ros M, Carrascosa JM, Arribas C, Martínez C, Andrés A, Gallardo N (2011) Regulation of Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Rat White Adipose Tissue upon Chronic Central Leptin Infusion: Effects on Adiposity. *Endocrinology* 152:1366-1377.
- Bottinelli R, Reggiani C (2000) Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 73:195-262.
- Boura-Halfon S, Zick Y (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 296:E581-E591.
- Briancon N, McNay DE, Maratos-Flier E, Flier JS (2010) Combined Neural Inactivation of Suppressor of Cytokine Signaling-3 and Protein-Tyrosine Phosphatase-1B Reveals Additive, Synergistic, and Factor-Specific Roles in the Regulation of Body Energy Balance. *Diabetes* 59:3074-3084.
- Buettner C, Patel R, Muse ED, Bhanot S, Monia BP, McKay R, Obici S, Rossetti L (2005) Severe impairment in liver insulin signaling fails to alter hepatic insulin action in conscious mice. *J Clin Invest* 115:1306-1313.
- Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, Su K, Cheng B, Li X, Harvey-White J, Schwartz GJ, Kunos G, Rossetti L (2008) Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med* 14:667-675.
- Byon JC, Kusari AB, Kusari J (1998) Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction. *Mol Cell Biochem* 182:101-108.
- Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE (2003) Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278:25323-25330.
- Carlson CJ, Koterski S, Sciotti RJ, Poccarr GB, Rondinone CM (2003) Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 52:634-641.
- Carrascosa JM, Ros M, Andrés A, Fernández-Agulló T, Arribas C (2009) Changes in the neuroendocrine control of energy homeostasis by adiposity signals during aging. *Exp Gerontol* 44:20-25.

- Carrascosa JM, Ruiz P, Martinez C, Pulido JA, Satrustegui J, Andres A (1989) Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. *Biochem Biophys Res Commun* 160:303-309.
- Carrascosa JM, Molero JC, Fermín Y, Martínez C, Andrés A, Satrústegui J (2001) Effects of chronic treatment with acarbose on glucose and lipid metabolism in obese diabetic Wistar rats. *Diabetes, obesity & metabolism* 3:240-248.
- Carrascosa JM, Andres A, Ros M, Bogonez E, Arribas C, Fernandez-Agullo T, De Solis AJ, Gallardo N, Martinez C Development of insulin resistance during aging: involvement of central processes and role of adipokines. *Curr Protein Pept Sci* 12:305-315.
- Carrascosa JM, Andres A, Ros M, Bogonez E, Arribas C, Fernandez-Agullo T, De Solis AJ, Gallardo N, Martinez C (2011) Development of insulin resistance during aging: involvement of central processes and role of adipokines. *Curr Protein Pept Sci* 12:305-315.
- Cartee GD, Wojtaszewski JF (2007) Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. *Appl Physiol Nutr Metab* 32:557-566.
- Cases JA, Barzilai N (2000) The regulation of body fat distribution and the modulation of insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4:S63-66.
- Catalano KJ, Bergman RN, Ader M (2005) Increased susceptibility to insulin resistance associated with abdominal obesity in aging rats. *Obes Res* 13:11-20.
- Ceddia RB, William WN, Curi R (1998a) Leptin increases glucose transport and utilization in skeletal muscle in vitro. *Gen Pharmacol* 31:799-801.
- Ceddia RB, William WN, Curi R (1999a) Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidence for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:75-82.
- Ceddia RB, William WN, Jr., Lima FB, Curi R (1998b) Leptin inhibits insulin-stimulated incorporation of glucose into lipids and stimulates glucose decarboxylation in isolated rat adipocytes. *J Endocrinol* 158:R7-9.
- Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G (2002) Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J* 16:1163-1176.
- Ceddia RB, Lopes G, Souza HM, Borba-Murad GR, William WN, Jr., Bazotte RB, Curi R (1999b) Acute effects of leptin on glucose metabolism of in situ rat perfused livers and isolated hepatocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1207-1212.
- Chakraborty A, Koldobskiy MA, Bello NT, Maxwell M, Potter JJ, Juluri KR, Maag D, Kim S, Huang AS, Dailey MJ, Saleh M, Snowman AM, Moran TH, Mezey E, Snyder SH (2010) Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. *Cell* 143:897-910.
- Chang L, Chiang SH, Saltiel AR (2004) Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10:65-71.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12:318-320.
- Chen D, Wang MW (2005) Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 7:307-317.
- Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I (2007) Role of insulin and growth hormone/insulin-like growth factor-I signaling in lifespan extension: rodent longevity models for studying aging and calorie restriction. *Curr Genomics* 8:423-428.
- Civitaresse AE, Ravussin E (2008) Mitochondrial energetics and insulin resistance. *Endocrinology* 149:950-954.
- Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmans S (2001) The lipid phosphatase SHIP2 controls

- insulin sensitivity. *Nature* 409:92-97.
- Coen PM, Dubé JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Ferrell RE, Toledo FGS, Goodpaster BH (2009) Insulin Resistance is Associated with Higher Intramyocellular Triglycerides in Type I but not Type II Myocytes Concomitant with Higher Ceramide Content. *Diabetes*.
- Cohen P (2006) The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:867-873.
- Coleman DL (2010) A historical perspective on leptin. *Nat Med* 16:1097-1099.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295.
- Copps KD, Hancer NJ, Opore-Ado L, Qiu W, Walsh C, White MF (2010) Irs1 serine 307 promotes insulin sensitivity in mice. *Cell Metabolism* 11:84-92.
- Das M, Gabriely I, Barzilai N (2004) Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obes Rev* 5:13-19.
- Dean DJ, Cartee GD (2000) Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 169:133-139.
- DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76:149-155.
- Denton RM, Tavaré JM (1995) Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur J Biochem* 227:597-611.
- Dey D, Basu D, Roy SS, Bandyopadhyay A, Bhattacharya S (2006) Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling. *Mol Cell Endocrinol* 246:60-64.
- Dube JJ, Bhatt BA, Dedousis N, Bonen A, O'Doherty RM (2007) Leptin, skeletal muscle lipids, and lipid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R642-650.
- Dubé JJ, Amati F, Toledo FGS, Stefanovic-Racic M, Rossi A, Coen P, Goodpaster BH (2011) Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia* 54:1147-1156.
- Dulloo AG, Stock MJ, Solinas G, Boss O, Montani JP, Seydoux J (2002) Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle. *FEBS Letters* 515:109-113.
- Dyck DJ (2009) Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. *Appl Physiol Nutr Metab* 34:396-402.
- Dyck DJ, Heigenhauser GJF, Bruce CR (2006) The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta physiologica (Oxford, England)* 186:5-16.
- Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, Shintani M, Miyanaga F, Aizawa-Abe M, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Gavrilova O, Reitman ML, Nakao K (2001) Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipoatrophic diabetes. *Diabetes* 50:1440-1448.
- Eguchi M, Gillis L, Liu Y, Lyakhovsky N, Du M, McDermott J, Sweeney G (2007) Regulation of SOCS-3 expression by leptin and its co-localization with insulin receptor in rat skeletal muscle cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 267:38-45.
- Einstein FH, Huffman DM, Fishman S, Jerschow E, Heo HJ, Atzmon G, Schechter C, Barzilai N, Muzumdar RH (2010) Aging per se increases the susceptibility to free fatty acid-induced insulin resistance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65:800-808.
- Emilsson V, Arch JR, de Groot RP, Lister CA, Cawthorne MA (1999) Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett* 455:170-174.
- Escrivá F, Gavete ML, Fermín Y, Pérez C, Gallardo N, Alvarez C, Andrés A, Ros M,

- Carrascosa JM (2007) Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol* 194:131-141.
- Facchini FS, Hua N, Abbasi F, Reaven GM (2001) Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3574-3578.
- Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Campoy F, Arribas C, Gallardo N, Andrés A, Ros M, Carrascosa JM (2001) Decreased leptin uptake in hypothalamic nuclei with ageing in Wistar rats. *J Endocrinol* 171:23-32.
- Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Pérez C, Peralta S, Arribas C, Andrés A, Carrascosa JM, Ros M (2002) Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia* 45:997-1003.
- Ferrannini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, Laakso M, Paolisso G, Smith U (1996) Insulin action and age. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetes* 45:947-953.
- Fisher J (2006) Potential Role of the AMP-activated Protein Kinase in Regulation of Insulin Action. *Cellscience* 2:68-81.
- Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, Barzilai N (2007) Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J* 21:53-60.
- Flier JS, Maratos-Flier E (2010) Lasker lauds leptin. *Cell Metabolism* 12:317-320.
- Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1:1311-1314.
- Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
- Friedrichsen M, Poulsen P, Richter EA, Hansen BF, Birk JB, Ribel-Madsen R, Stender-Petersen K, Nilsson E, Beck-Nielsen H, Vaag A, Wojtaszewski JFP (2010) Differential aetiology and impact of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and Akt signalling in skeletal muscle on in vivo insulin action. *Diabetologia*:1-10.
- Frühbeck G (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393:7-20.
- Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JAL, Guerra B (2010) Leptin receptor 170 kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Experimental Physiology* 95:160-171.
- Fujii N, Jessen N, Goodyear LJ (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E867-877.
- Fujishiro M, Gotoh Y, Katagiri H, Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Onishi Y, Ono H, Funaki M, Inukai K, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T (2001) MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem* 276:19800-19806.
- Fürnsinn C, Brunmair B, Furtmüller R, Roden M, Englisch R, Waldhäusl W (1998) Failure of leptin to affect basal and insulin-stimulated glucose metabolism of rat skeletal muscle in vitro. *Diabetologia* 41:524-529.
- Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N (2002) Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 51:2951-2958.
- Galgani JE, Moro C, Ravussin E (2008) Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1009-1017.
- Galic S, Oakhill J, Steinberg G (2009) Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Gallardo N, Arribas C, Villar M, Ros M, Carrascosa JM, Martínez C, Andrés A (2005) ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinology* 146:4934-4942.

- Gallardo N, Bonzón-Kulichenko E, Fernández-Agulló T, Moltó E, Gómez-Alonso S, Blanco P, Carrascosa JM, Ros M, Andrés A (2007) Tissue-specific effects of central leptin on the expression of genes involved in lipid metabolism in liver and white adipose tissue. *Endocrinology* 148:5604-5610.
- Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277:48115-48121.
- Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J (2004) Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2024-2034.
- García-San Frutos M, Fernández-Agulló T, De Solís AJ, Andrés A, Arribas C, Carrascosa JM, Ros M (2007) Impaired central insulin response in aged Wistar rats: role of adiposity. *Endocrinology* 148:5238-5247.
- Geiger PC, Wright DC, Han D-H, Holloszy JO (2005) Activation of p38 MAP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E782-788.
- German JP, Thaler JP, Wisse BE, Oh-I S, Sarruf DA, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ, Schwartz MW, Morton GJ (2011) Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology* 152:394-404.
- Ginsberg HN (2000) Insulin resistance and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation* 106:453-458.
- Godl K, Wissing J, Kurtenbach A, Habenberger P, Blencke S, Gutbrod H, Salassidis K, Stein-Gerlach M, Missio A, Cotten M, Daub H (2003) An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15434-15439.
- Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Martinez JA (1999) Leptin, but not a beta 3-adrenergic agonist, upregulates muscle uncoupling protein-3 messenger RNA expression: short-term thermogenic interactions. *Cell Mol Life Sci* 55:992-997.
- Gong Y, Ishida-Takahashi R, Villanueva EC, Fingar DC, Munzberg H, Myers MG, Jr. (2007) The long form of the leptin receptor regulates STAT5 and ribosomal protein S6 via alternate mechanisms. *J Biol Chem* 282:31019-31027.
- González-Rodríguez A, Mas Gutierrez JA, Sanz-González S, Ros M, Burks DJ, Valverde AM (2010) Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice. *Diabetes* 59:588-599.
- Goodman MN, Dluz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB (1983) Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: changes during 3-96 weeks of age. *Am J Physiol* 244:E93-100.
- Goodpaster BH, Wolf D (2004) Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatr Diabetes* 5:219-226.
- Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE (2000) Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* 49:467-472.
- Guarente L (2008) Mitochondria—A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell* 132:171-176.
- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, Calbet JAL (2007) Leptin receptors in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102:1786-1792.
- Guma A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Klip A (1995) Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 268:E613-622.
- Gutiérrez-Juárez R, Obici S, Rossetti L (2004) Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. *J Biol Chem* 279:49704-49715.
- Haar EV, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9:316-323.
- Haeusler RA, Accili D (2008) The double life of Irs. *Cell Metab* 8:7-9.
- Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM (1997)

- Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8878-8883.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546.
- Halseth AE, Bracy DP, Wasserman DH (2000) Limitations to basal and insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake in the high-fat-fed rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E1064-1071.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
- Hansen PA, Han DH, Marshall BA, Nolte LA, Chen MM, Mueckler M, Holloszy JO (1998) A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle. Functional evaluation of potential mechanisms. *J Biol Chem* 273:26157-26163.
- Harvey J, Ashford MLJ (2003) Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* 44:845-854.
- Hay N (2010) Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab*.
- Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ (1998) Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47:1369-1373.
- Hegele RA (2003) Monogenic forms of insulin resistance: apertures that expose the common metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 14:371-377.
- Hegyi K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A (2004) Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 28:159-169.
- Hillebrand JJG, de Wied D, Adan RAH (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23:2283-2306.
- Hirabara SM, Silveira LR, Abdulkader F, Carvalho CRO, Procopio J, Curi R (2007) Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J Cell Physiol* 210:7-15.
- Ho RC, Fujii N, Witters LA, Hirshman MF, Goodyear LJ (2007) Dissociation of AMP-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 362:354-359.
- Holloszy JO, Fontana L (2007) Caloric restriction in humans. *Exp Gerontol* 42:709-712.
- Horrillo D SJ, Arribas C, Frutos MGS, Carrascosa JM, Luzurica M, Fernandez-agullo T and Ros M. (2011) Age-associated development of inflammation in Wistar rats: Effects of caloric restriction. *Archives of Physiology and Biochemistry* in press.
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.
- Huang W, Dedousis N, Bandi A, Lopaschuk GD, O'Doherty RM (2006) Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in vivo. *Endocrinology* 147:1480-1487.
- Huffman DM, Barzilai N (2009) Role of visceral adipose tissue in aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790:1117-1123.
- Hunt ND, Hyun D-H, Allard JS, Minor RK, Mattson MP, Ingram DK, de Cabo R (2006) Bioenergetics of aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 5:125-143.
- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Tasso R, Liverini G (2004) A possible link between skeletal muscle mitochondrial efficiency and age-induced insulin resistance. *Diabetes* 53:2861-2866.
- James DE, Zorzano A, Böni-Schnetzler M, Nemenoff RA, Powers A, Pilch PF, Ruderman NB (1986) Intrinsic differences of insulin receptor kinase activity in red and white muscle. *J Biol Chem* 261:14939-14944.
- Janovská A, Hatzinikolas G, Staikopoulos V, McInerney J, Mano M, Wittert GA (2008) AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type

- and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 284:1-10.
- Jéquier E (2002) Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 967:379-388.
- Jing M, Cheruvu VK, Ismail-Beigi F (2008) Stimulation of glucose transport in response to activation of distinct AMPK signaling pathways. *Am J Physiol, Cell Physiol* 295:C1071-1082.
- Johnson MA, Polgar J, Weightman D, Appleton D (1973) Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sci* 18:111-129.
- Kadowaki T (2000) Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J Clin Invest* 106:459-465.
- Kahn BB, Flier JS (2000) Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 106:473-481.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840-846.
- Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH (2000) Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8536-8541.
- Kalra S (2009) Central leptin gene therapy ameliorates diabetes type 1 and 2 through two independent hypothalamic relays; a benefit beyond weight and appetite regulation. *Peptides*.
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389:374-377.
- Kanzaki M, Pessin JE (2001) Signal integration and the specificity of insulin action. *Cell Biochem Biophys* 35:191-209.
- Karakelides H, Irving BA, Short KR, O'Brien P, Nair KS (2009) Age, obesity, and sex effects on insulin sensitivity and skeletal muscle mitochondrial function. *Diabetes*.
- Karsenty G (2001) Leptin controls bone formation through a hypothalamic relay. *Recent Prog Horm Res* 56:401-415.
- Kasuga M (2006) Insulin resistance and pancreatic cell failure. *Journal of Clinical Investigation* 116:1756-1760.
- Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* 195:109-118.
- Kayali AG, Austin DA, Webster NJ (2000) Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 49:1783-1793.
- Kelley DE, Goodpaster BH (2001) Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care* 24:933-941.
- Kennedy BP, Ramachandran C (2000) Protein tyrosine phosphatase-1B in diabetes. *Biochem Pharmacol* 60:877-883.
- Kennedy GC (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140:578-596.
- Kido Y, Nakae J, Accili D (2001) Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 86:972-979.
- Kim J-A, Wei Y, Sowers JR (2008) Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circulation Research* 102:401-414.
- Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB (2000) In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* 141:2328-2339.
- Klip A (2009) The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab* 34:481-487.
- Kloting N, Bluher M (2005) Extended longevity and insulin signaling in adipose

- tissue. *Exp Gerontol* 40:878-883.
- Koch C, Augustine RA, Steger J, Ganjam GK, Benzler J, Pracht C, Lowe C, Schwartz MW, Shepherd PR, Anderson GM, Grattan DR, Tups A (2010) Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *Journal of Neuroscience* 30:16180-16187.
- Koistinen HA, Chibalin AV, Zierath JR (2003) Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 46:1324-1328.
- Konrad D, Somwar R, Sweeney G, Yaworsky K, Hayashi M, Ramlal T, Klip A (2001) The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes* 50:1464-1471.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JRB, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM (2008) Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7:45-56.
- Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI (1999) Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42:113-116.
- Ladyman SR (2008) Leptin resistance during pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* 20:269-277.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635.
- Lelliott C, Vidal-Puig AJ (2004) Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4:S22-28.
- Lemieux K, Konrad D, Klip A, Marette A (2003) The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *FASEB J* 17:1658-1665.
- Liu Y, Wan Q, Guan Q, Gao L, Zhao J (2006) High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKα in rats' skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 339:701-707.
- Long YC, Zierath JR (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116:1776-1783.
- Louis GW, Myers MG (2007) The role of leptin in the regulation of neuroendocrine function and CNS development. *Rev Endocr Metab Disord* 8:85-94.
- Macko AR, Beneze AN, Teachey MK, Henriksen EJ (2008) Roles of insulin signalling and p38 MAPK in the activation by lithium of glucose transport in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Arch Physiol Biochem* 114:331-339.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
- Marette A, Richardson JM, Ramlal T, Balon TW, Vranic M, Pessin JE, Klip A (1992) Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am J Physiol* 263:C443-452.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA (2002) Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407-1433.
- Marks JL, Porte D, Jr., Stahl WL, Baskin DG (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127:3234-3236.
- Martin OJ, Lee A, McGraw TE (2006) GLUT4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin-

- modulated bipartite dynamic mechanism. *J Biol Chem* 281:484-490.
- Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB (2006) Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281:18933-18941.
- Masoro EJ (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126:913-922.
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11285-11290.
- McCurdy CE, Davidson RT, Cartee GD (2005) Calorie restriction increases the ratio of phosphatidylinositol 3-kinase catalytic to regulatory subunits in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E996-E1001.
- McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, Ruge T, Gilbert M, Fielding BA, Frayn KN, Karpe F (2011) Downregulation of adipose tissue Fatty Acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes* 60:47-55.
- Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404:1-13.
- Michelle Furtado L, Poon V, Klip A (2003) GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiol Scand* 178:287-296.
- Minokoshi Y, Haque MS, Shimazu T (1999) Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48:287-291.
- Minokoshi Y, Kim Y-B, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343.
- Molero JC, Pérez C, Martínez C, Villar M, Andrés A, Fermín Y, Carrascosa JM (2002) Activation of MAP kinase by insulin and vanadate in adipocytes from young and old rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 189:77-84.
- Mora A, Sakamoto K, McManus EJ, Alessi DR (2005) Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett* 579:3632-3638.
- Mora S, Pessin JE (2002) An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev* 18:345-356.
- Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A (2004) Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med* 10:739-743.
- Morino K, Neschen S, Bilz S, Sono S, Tsigotis D, Reznick RM, Moore I, Nagai Y, Samuel V, Sebastian D, White M, Philbrick W, Shulman GI (2008) Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* 57:2644-2651.
- Moustaid N, Jones BH, Taylor JW (1996) Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J Nutr* 126:865-870.
- Muller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G (1997) Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272:10585-10593.
- Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ (2008) Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E15-26.
- Münzberg H, Myers MG (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8:566-570.
- Muoio DM, Lynis Dohm G (2002) Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16:653-666.
- Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA (1997) Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46:1360-1363.
- Murdolo G, Smith U (2006) The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1:S35-38.

- Mussig K, Staiger H, Fiedler H, Moeschel K, Beck A, Kellerer M, Haring HU (2005) Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 280:32693-32699.
- Mutze J, Roth J, Gerstberger R, Hubschle T (2007) Nuclear translocation of the transcription factor STAT5 in the rat brain after systemic leptin administration. *Neurosci Lett* 417:286-291.
- Muzumdar R, Allison DB, Huffman DM, Ma X, Atzmon G, Einstein FH, Fishman S, Poduval AD, McVei T, Keith SW, Barzilai N (2008) Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. *Aging Cell* 7:438-440.
- Myers MG, Münzberg H, Leininger GM, Leshan RL (2009) The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metabolism* 9:117-123.
- Nishino N, Tamori Y, Kasuga M (2007) Insulin efficiently stores triglycerides in adipocytes by inhibiting lipolysis and repressing PGC-1 α induction. *Kobe J Med Sci* 53:99-106.
- Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Jr., Seeley RJ, Schwartz MW (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52:227-231.
- Niu W, Huang C, Nawaz Z, Levy M, Somwar R, Li D, Bilan PJ, Klip A (2003) Maturation of the regulation of GLUT4 activity by p38 MAPK during L6 cell myogenesis. *J Biol Chem* 278:17953-17962.
- Ogawa W, Matozaki T, Kasuga M (1998) Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Mol Cell Biochem* 182:13-22.
- Osman AA, Pendergrass M, Koval J, Maezono K, Cusi K, Pratipanawatr T, Mandarino LJ (2000) Regulation of MAP kinase pathway activity in vivo in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E992-999.
- Pal R, Sahu A (2003) Leptin signaling in the hypothalamus during chronic central leptin infusion. *Endocrinology* 144:3789-3798.
- Partridge L, Piper MD, Mair W (2005) Dietary restriction in *Drosophila*. *Mech Ageing Dev* 126:938-950.
- Peralta S, Carrascosa JM, Gallardo N, Ros M, Arribas C (2002) Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction. *Biochem Biophys Res Commun* 296:425-428.
- Pérez C, Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Arribas C, Andrés A, Ros M, Carrascosa JM (2004) Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53:347-353.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Phelan JP, Rose MR (2005) Why dietary restriction substantially increases longevity in animal models but won't in humans. *Ageing Res Rev* 4:339-350.
- Porte D, Jr., Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW (1998) Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 41:863-881.
- Qiang W, Weiqiang K, Qing Z, Pengju Z, Yi L (2007) Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPK α . *Exp Mol Med* 39:535-543.
- Randle PJ (1998) Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes/metabolism reviews* 14:263-283.
- Randle PJ, Priestman DA, Mistry S, Halsall A (1994) Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37 Suppl 2:S155-161.
- Ranganathan S, Ciaraldi TP, Henry RR, Mudaliar S, Kern PA (1998) Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology* 139:2509-2513.
- Reaven GM (1995) Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev* 75:473-486.
- Redman LM, Huffman KM, Landerman LR, Pieper CF, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Wenner BR, Kraus VB, Newgard CB, Kraus WE, Ravussin E

- (2010) Effect of Caloric Restriction with and without Exercise on Metabolic Intermediates in Nonobese Men and Women. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Ribé D, Yang J, Patel S, Koumanov F, Cushman SW, Holman GD (2005) Endofacial competitive inhibition of glucose transporter-4 intrinsic activity by the mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580. *Endocrinology* 146:1713-1717.
- Rincon M, Muzumdar R, Atzmon G, Barzilai N (2004) The paradox of the insulin/IGF-1 signaling pathway in longevity. *Mech Ageing Dev* 125:397-403.
- Robertson S, Ishida-Takahashi R, Tawara I, Hu J, Patterson CM, Jones JC, Kulkarni RN, Myers MG (2010) Insufficiency of Janus kinase 2-autonomous leptin receptor signals for most physiologic leptin actions. *Diabetes* 59:782-790.
- Roman EA, Reis D, Romanatto T, Maimoni D, Ferreira EA, Santos GA, Torsoni AS, Velloso LA, Torsoni MA (2009) Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 314:62-69.
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320-344.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277:42394-42398.
- Sahu A (2004) Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145:2613-2620.
- Saltiel AR (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104:517-529.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Saltiel AR, Pessin JE (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 12:65-71.
- Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C (2003) Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 133:11-19.
- Scarpace PJ, Matheny M, Shek EW (2000) Impaired leptin signal transduction with age-related obesity. *Neuropharmacology* 39:1872-1879.
- Scarpace PJ, Matheny M, Tümer N (2001) Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats. *Neuroscience* 104:1111-1117.
- Scherer T, O'hare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, Zielinski E, Vempati P, Su K, Dighe S, Milsom T, Puchowicz M, Scheja L, Zechner R, Fisher SJ, Previs SF, Buettner C (2011) Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metabolism* 13:183-194.
- Scheperd PR, Whiter DJ, Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*. 333: 471-90.
- Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225.
- Schmitz-Peiffer C (2000) Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* 12:583-594.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D, Jr. (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13:387-414.
- Schwenk RW, Dirkx E, Coumans WA, Bonen A, Klip A, Glatz JFC, Luiken JJFP (2010) Requirement for distinct vesicle-associated membrane proteins in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced translocation of GLUT4 and CD36 in cultured cardiomyocytes. *Diabetologia* 53:2209-2219.
- Seino S, Bell GI (1989) Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159:312-316.
- Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckel J (2006) The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 17:416-422.
- Sell H, Eckardt K, Taube A, Tews D, Gurgui M, Van Echten-Deckert G, Eckel J. (2008) Skeletal muscle insulin resistance induced by adipocyte-conditioned

- medium: underlying mechanisms and reversibility. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294:E1070-7
- Serrano R, Villar M, Gallardo N, Carrascosa JM, Martinez C, Andrés A (2009) The effect of aging on insulin signalling pathway is tissue dependent: central role of adipose tissue in the insulin resistance of aging. *Mech Ageing Dev* 130:189-197.
- Sharma N, Arias EB, Sajan MP, MacKrell JG, Bhat AD, Farese RV, Cartee GD (2010) Insulin resistance for glucose uptake and Akt2 phosphorylation in the soleus, but not epitrochlearis, muscles of old vs. adult rats. *J Appl Physiol* 108:1631-1640.
- Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Nair KS (2005) Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5618-5623.
- Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J (1993) The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260:1953-1955.
- Smith U (2002) Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:897-904.
- Smith U, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C (1999) Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 892:119-126.
- Somwar R, Niu W, Kim DY, Sweeney G, Randhawa VK, Huang C, Ramlal T, Klip A (2001a) Differential effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition on intracellular signals regulating GLUT4 translocation and glucose transport. *J Biol Chem* 276:46079-46087.
- Somwar R, Kim DY, Sweeney G, Huang C, Niu W, Lador C, Ramlal T, Klip A (2001b) GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 359:639-649.
- Somwar R, Perreault M, Kapur S, Taha C, Sweeney G, Ramlal T, Kim DY, Keen J, Côte CH, Klip A, Marette A (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. *Diabetes* 49:1794-1800.
- Song XM, Ryder JW, Kawano Y, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR (1999) Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction. *Am J Physiol* 277:R1690-1696.
- Steinberg GR, Dyck DJ (2000) Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E1374-1382.
- Steinberg GR, Watt MJ, Febbraio MA (2009) Cytokine Regulation of AMPK signalling. *Front Biosci* 14:1902-1916.
- Suarez E, Bach D, Cadefau J, Palacin M, Zorzano A, Guma A (2001) A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J Biol Chem* 276:18257-18264.
- Sun XJ, Liu F (2009) Phosphorylation of IRS proteins Yin-Yang regulation of insulin signaling. *Vitam Horm* 80:351-387.
- Sweeney G (2002) Leptin signalling. *Cell Signal* 14:655-663.
- Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem* 274:10071-10078.
- Sweeney G, Keen J, Somwar R, Konrad D, Garg R, Klip A (2001) High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 142:4806-4812.
- Szanto I, Kahn CR (2000) Selective interaction between leptin and insulin signaling

- pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2355-2360.
- Tajmir P, Kwan JJ-M, Kessas M, Mozammel S, Sweeney G (2003) Acute and chronic leptin treatment mediate contrasting effects on signaling, glucose uptake, and GLUT4 translocation in L6-GLUT4myc myotubes. *J Cell Physiol* 197:122-130.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96.
- Tanti JF, Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, Barres R, Le Marchand-Brustel Y (2004) Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol (Paris)* 65:43-48.
- Thirone ACP, Huang C, Klip A (2006) Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 17:72-78.
- Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410:227-230.
- Todd M, Yaspelkisiii B, Turcotte L (2005) Short-term leptin treatment increases fatty acids uptake and oxidation in muscle of high fat-fed rats. *Metabolism* 54:1218-1224.
- Toledo FGS, Menshikova EV, Azuma K, Radikova Z, Kelley CA, Ritov VB, Kelley DE (2007) Mitochondrial Capacity in Skeletal Muscle Is Not Stimulated by Weight Loss Despite Increases in Insulin Action and Decreases in Intramyocellular Lipid Content. *Diabetes* 57:987-994.
- Treebak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, Jørgensen SB, Viollet B, Andersson L, Neumann D, Wallimann T, Richter EA, Chibalin AV, Zierath JR, Wojtaszewski JFP (2006) AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes* 55:2051-2058.
- Tremblay F, Dubois MJ, Marette A (2003) Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Front Biosci* 8:d1072-1084.
- Tups A (2009) Physiological models of leptin resistance. *J Neuroendocrinol* 21:961-971.
- Unger RH (1997) How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Trends Endocrinol Metab* 8:276-282.
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM (1996) Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14:95-97.
- Valverde AM, Lorenzo M, Pons S, White MF, Benito M (1998) Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 12:688-697.
- van den Brink GR, O'Toole T, Hardwick JC, van den Boogaardt DE, Versteeg HH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (2000) Leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:144-150.
- Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444:875-880.
- Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR, Jr. (1997) Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99:385-390.
- Van Obberghen E, Baron V, Delahaye L, Emanuelli B, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Lebrun P, Mothe-Satney I, Peraldi P, Rocchi S, Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, Giudicelli J (2001) Surfing the insulin signaling web. *Eur J Clin Invest* 31:966-977.
- Vijg J, Suh Y (2005) Genetics of Longevity and Aging. *Annu Rev Med* 56:193-212.
- Villanueva EC, Myers MG (2008) Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Int J Obes Relat Metab Disord* 32 Suppl 7:S8-12.
- Villar M, Serrano R, Gallardo N, Carrascosa JM, Martinez C, Andrés A (2006) Altered subcellular distribution of IRS-1 and IRS-3 is associated with defective Akt

- activation and GLUT4 translocation in insulin-resistant old rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1763:197-206.
- Vinciguerra M, Foti M (2006) PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling. *Arch Physiol Biochem* 112:89-104.
- Walker G, Houthoofd K, Vanfleteren JR, Gems D (2005) Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mech Ageing Dev* 126:929-937.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR (2004) Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27:1487-1495.
- Wang JL, Chinookoswong N, Scully S, Qi M, Shi ZQ (1999) Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinology* 140:2117-2124.
- Wang Z, Zhou YT, Kakuma T, Lee Y, Kalra SP, Kalra PS, Pan W, Unger RH (2000) Leptin resistance of adipocytes in obesity: role of suppressors of cytokine signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 277:20-26.
- Weigert C, Hennige AM, Brischmann T, Beck A, Moeschel K, Schaüble M, Brodbeck K, Häring H-U, Schleicher ED, Lehmann R (2005) The phosphorylation of Ser318 of insulin receptor substrate 1 is not per se inhibitory in skeletal muscle cells but is necessary to trigger the attenuation of the insulin-stimulated signal. *J Biol Chem* 280:37393-37399.
- Whitehead JP, Clark SF, Urso B, James DE (2000) Signalling through the insulin receptor. *Curr Opin Cell Biol* 12:222-228.
- Widdowson PS, Upton R, Buckingham R, Arch J, Williams G (1997) Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. *Diabetes* 46:1782-1785.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
- Winder WW, Hardie DG (1999) AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277:E1-10.
- Xi X, Han J, Zhang JZ (2001) Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276:41029-41034.
- Yabaluri N, Bashyam MD Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* 35:473-484.
- Yalow RS, Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest.* 39:1157-75.
- Yamauchi K, Pessin JE (1994) Insulin receptor substrate-1 (IRS1) and Shc compete for a limited pool of Grb2 in mediating insulin downstream signaling. *J Biol Chem* 269:31107-31114.
- Yaspelkis BB, Ansari L, Ramey EL, Holland GJ, Loy SF (1999) Chronic leptin administration increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake and transport. *Metab Clin Exp* 48:671-676.
- Yaspelkis BB, 3rd, Kvasha IA, Figueroa TY (2009) High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKKalpha/beta phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R1709-1715.
- Youngren JF (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64:873-891.
- Yu Y-H (2005) Adipocyte Signaling and Lipid Homeostasis: Sequelae of Insulin-Resistant Adipose Tissue. *Circulation Research* 96:1042-1052.
- Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG (2002) PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2:489-495.
- Zeigerer A, McBrayer MK, McGraw TE (2004) Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. *Mol Biol Cell* 15:4406-4415.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional

- cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zheng Y, Zhang W, Pendleton E, Leng S, Wu J, Chen R, Sun XJ (2009) Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese Zucker rats. *J Endocrinol* 203:337-347.
- Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H (2000) Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 43:821-835.
- Zucker LM, Antoniades HN (1972) Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology* 90:1320-1330.

Anexos

EFFECTS OF CHRONIC ACARBOSE TREATMENT ON ADIPOCYTE INSULIN RESPONSIVENESS, SERUM LEVELS OF LEPTIN AND ADIPONECTIN AND HYPOTHALAMIC NPY EXPRESSION IN OBESE DIABETIC WISTAR RATS

Coralía Pérez,* Teresa Fernández-Agulló,[†] Alain J De Solís,* Manuel Ros,[†] Antonio Andrés[‡] and José M Carrascosa*

*Centre of Molecular Biology 'Severo Ochoa', Faculty of Sciences, Autonomous University,[†]Health Sciences Faculty, University Rey Juan Carlos, Alcorcón, Madrid and [‡]Biochemistry Section, Faculty of Chemistry, Regional Centre of Biomedical Research, University of Castilla La Mancha, Ciudad Real, Spain

SUMMARY

1. Inhibitors of intestinal glucosidases have been shown to improve glycaemic control in diabetic and obese humans and animals. In the present study, we have investigated the effect of 3 months treatment with acarbose on adiposity, food intake and the modulation of hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in obese diabetic Wistar (WDF) rats and the possible correlation between changes in overall insulin sensitivity and the level of circulating adipokines, leptin and adiponectin. In addition, we investigated the effect of acarbose on adipocyte insulin signalling.

2. Mature male WDF rats were randomly distributed to one of three treatment groups (no acarbose or 20 or 40 mg of acarbose/100 g diet). After 3 months, blood glucose, cholesterol, triglyceride, insulin, leptin and adiponectin were analysed. Insulin signalling was determined in isolated adipocytes as the stimulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt phosphorylation; the level of hypothalamic NPY was assessed by immunohistochemistry.

3. Acarbose-treated rats had lower levels of blood glucose, cholesterol, triglyceride, insulin and leptin and an increase in adiponectin compared with untreated animals. There were no changes in bodyweight and adiposity. Stimulation of adipocyte MAPK activity by insulin was higher in rats treated with both doses of acarbose, whereas higher stimulation of Akt phosphorylation was observed with the highest dose of acarbose. Although food intake was not significantly reduced in rats treated with acarbose, the acarbose-treated rats had lower NPY expression in the arcuate nucleus.

4. We conclude that the improvement in overall insulin sensitivity in WDF rats after prolonged acarbose treatment is paralleled by increases in circulating adiponectin and adipocyte insulin responsiveness. Acarbose neither decreases food intake

nor reverts obesity, but decreases leptin levels and the expression of the orexigenic NPY in the hypothalamus.

Key words: acarbose, adiponectin, insulin signalling, leptin, neuropeptide Y, obesity.

INTRODUCTION

Acarbose is a complex oligosaccharide of microbial origin that binds competitively to the α -glucosidases at the brush border of the small intestine, thus delaying the breakdown of sucrose, starch and complex carbohydrates and the absorption of glucose and fructose. It has proven efficacious in reducing post-prandial increases in glucose and insulin.^{1–3} Several clinical trials have shown the efficacy of acarbose in improving glycaemic control in obese hypertensive subjects with normal glucose tolerance⁴ and in individuals with either impaired glucose tolerance^{5,6} or overt diabetes.^{7–13} However, with regard to the effect of acarbose on overall insulin sensitivity, controversial data have been reported. Thus, an improvement of insulin sensitivity has been observed in obese⁴ and glucose-intolerant⁵ subjects, as well as in elderly¹⁰ and obese¹⁴ type 2 diabetics, whereas no changes have been reported in most studies with diabetic patients.^{7–9,12}

Changes in insulin action at the tissue level in response to prolonged administration of acarbose have been studied in obese mice and rats. Administration of acarbose over a period of 4 months to mice made obese by gold-thioglucose treatment did not result in any improvement of isolated soleus muscle insulin sensitivity, despite an effect on bodyweight and glycaemic control.¹⁵ In obese Zucker rats, treatment with acarbose for a period of 12 weeks results in marked improvement of glucose tolerance, overall insulin sensitivity and insulin action on glucose transporter (GLUT)-4 translocation to the plasma membrane in soleus and cardiac muscle.¹⁶ In obese diabetic Wistar (WDF) rats, we have reported previously that chronic treatment with acarbose improves glycaemic and lipidic control and ameliorates overall insulin sensitivity.¹⁷

In addition to its effects on glycaemic control and insulin sensitivity, acarbose treatment has been reported to decrease bodyweight in obese rats^{16,17} and mice,¹⁵ as well as circulating leptin in both lean and obese Zucker rats.¹⁶ Leptin is mainly produced by the adipose tissue and we have recently reported that hyperleptinaemia impairs insulin signalling in rat isolated adipocytes.¹⁸ Because the insulin resistance of adipose tissue appears to play a key role in the development

Correspondence: Professor José M Carrascosa, Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Facultad de Ciencias, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain. Email: jmcarrascosa@cbm.uam.es

Received 6 June 2007; revision 2 August 2007; accepted 8 August 2007.

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

of overall insulin resistance,¹⁹ we hypothesize that acarbose treatment may result in an improvement of insulin signalling in adipose cells. In the present study, we investigated whether administration of acarbose over a period of 3 months to mature WDF rats improves insulin signalling in adipocytes. In addition, we explored the effect of acarbose on leptin and adiponectin levels, adiposity, food intake and on the hypothalamic expression of the orexigenic neuropeptide Y (NPY) in order to better understand its possible role in modulating energy homeostasis.

METHODS

Animals

Male Wistar diabetic fatty rats (Vc : WDF/Ta-*fa*) were obtained from the Vassar College (Poughkeepsie, NY, USA). The origin of this strain, developed by crossing the genetically obese Zucker rat with the carbohydrate intolerant lean Wistar Kyoto rat, has been described previously.^{17,20} The strain represents an adequate model of mild type 2 diabetes with associated obesity. Animals were housed in groups of four to five rats under a 12 h light–dark cycle. Animals were handled according to the European Union laws and the guidelines of the National Institutes of Health (USA) and the experimental procedures were approved by the Institutional Committee of Research Ethics.

Acarbose treatment

In total, 27 mature animals, 15–17 weeks of age, were randomly distributed into three groups. Each group was fed for a period of 3 months with standard laboratory chow containing either no acarbose or 20 or 40 mg acarbose/100 g diet. For each animal, daily food intake was determined over a period of 7 days before starting acarbose treatment as the daily difference between the amount of food provided and that remaining. This allows assessment of the actual dose of acarbose for each rat. Mean acarbose doses were 9.0 ± 0.3 mg/kg bodyweight per day for rats fed chow containing 20 mg acarbose/100 g diet and 17.9 ± 0.8 mg/kg bodyweight per day for rats on the diet containing 40 mg acarbose/100 g diet. Blood samples were taken from overnight-fasted animals to determine glucose and insulin. Table 1 shows the characteristics of the three treatment groups before the administration of acarbose.

Isolation of adipocytes and assessment of mitogen-activated protein kinase activity and phosphorylated Akt

After 3 months treatment without or with acarbose, rats were killed under tribromoethanol anaesthesia (250 mg/100 g bodyweight) and visceral fat was removed and weighed to assess adiposity.

Table 1 Baseline characteristics of the three groups

	Acarbose (mg/100 g diet)			<i>P</i> (ANOVA)
	0	20	40	
Age (weeks)	15.3 ± 0.5	15.4 ± 0.4	16.2 ± 0.4	0.5036
Bodyweight (g)	524 ± 22	526 ± 19	536 ± 25	0.9169
Blood glucose (mg/dL)	221 ± 16	250 ± 14	236 ± 16	0.4271
Serum insulin (ng/mL)	3.6 ± 0.2	3.1 ± 1.1	2.7 ± 0.8	0.7468

Data are mean ± SEM of eight to nine animals per group.

Rats were randomly distributed into three groups of similar age. Bodyweight and fasting blood glucose and serum insulin concentrations were estimated as described in the Methods.

Adipocytes were isolated from perirenal fat by the collagenase method, as reported previously,^{18,21} and incubated for 5 min in the presence or absence of 16 nmol/L porcine insulin or 1 mmol/L Na₃VO₄.²² Following incubation, cytosolic extracts were obtained as reported previously.^{21,22} For the determination of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, approximately 500 µg cytosolic protein was immunoprecipitated with anti-MAPK 1/2 antibodies (UBI, Lake Placid, NY, USA) according to the manufacturer's instructions; immunoprecipitates were incubated for 20 min with 0.5 mg/mL myelin basic protein (MBP) and 50 µmol/L [γ -³²P]-ATP and phospho-MBP was resolved on 12% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), visualized by autoradiography and quantified by scanning densitometry.²²

Phosphorylation of Akt was determined in cytosolic extracts as reported previously.²³ Equal amounts of proteins were resolved on a 10% SDS-PAGE gel under reducing conditions, transferred to nitrocellulose and incubated overnight at 4°C with monoclonal anti-phosphorylated (p)-Akt (Ser473; Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA). Detection of antigen-bound antibody was performed by incubating the blots with horse anti-mouse peroxidase-conjugated IgG (dilution 1 : 5000; Vector, Burlingame, CA, USA) and the immunolabelled bands were visualized by the enhanced chemiluminescence (ECL) method (Amersham Biosciences Europe, Barcelona, Spain).

Immunohistochemical detection of hypothalamic NPY

Coronal sections (40 µm) of the hypothalamus from rats cardially perfused and fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4, were treated to block endogenous peroxidase with 1% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 48 h at 4°C with rabbit anti-NPY antiserum (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA; dilution 1 : 1000) in PBS containing 0.3% Triton-X 100 and 1% gelatin. Sections were processed according to the immunoperoxidase procedure and mounted as described previously.²⁴

Image analysis was performed using the SQ500 program (Leika, Solms, Germany). Digital black and white photographs of similar levels of arcuate nucleus were used for measurements. Binary grey detection over a selected grey level allowed measurement of the area covered by the binary selection. The grey level was chosen in advance, on the basis of good resolution of the area from a random section. In each image, this level was corrected using the mean level of grey of the clearest background area. Images from high- and low-power resolution micrographs (×10 and ×40, respectively) belonging to two coronal sections 480 µm apart from the arcuate nucleus were used for analysis in each animal. Five untreated animals and six animals treated with each dose of acarbose were used for analysis.

Other determinations

During the 3rd month of treatment, food intake was assessed as described above. For each rat, seven determinations were made and the mean was considered as the individual daily food intake. Actual doses of acarbose derived from those data were 8.8 ± 0.1 and 16.8 ± 0.8 mg/kg bodyweight per day for rats treated with diet containing 20 and 40 mg acarbose/100 g, respectively, which was not significantly different from values at the beginning of the trial.

Blood glucose and cholesterol were determined using a glucose and cholesterol analyser (Accutrend; Roche, Mannheim, Germany). Serum insulin, leptin and adiponectin were determined using rat radioimmunoassay kits from Linco Research (St Charles, MO, USA). Serum triglyceride was measured with an enzymatic kit (ITC Diagnostics, Izasa, Spain).

Adiposity and the obesity Lee index were calculated as described previously.²⁵

Statistical analysis

Statistical comparisons were made by one-way analysis of variance (ANOVA) using Prophet software (BNN Systems and Technologies, Cambridge, MA, USA). When significant differences were found, Duncan's post hoc test for multiple comparisons was used.

Table 2 Characteristics of the animals after treatment with acarbose during 3 months

	Acarbose (mg/100 g diet)			P (ANOVA)
	0	20	40	
Bodyweight (g)	645 ± 19	638 ± 19	655 ± 17	0.817
Blood glucose (mg/dL)	194 ± 10	163 ± 10*	156 ± 5*	0.018
Serum insulin (ng/mL)	7.4 ± 1.0	5.7 ± 0.7	4.6 ± 0.1*	0.039
Serum leptin (ng/mL)	127 ± 12	89 ± 5*	93 ± 4*	0.005
Serum adiponectin (µg/mL)	3.1 ± 0.1	3.8 ± 0.2*	3.9 ± 0.2*	0.048
Adiposity index (%)	11.2 ± 0.7	9.9 ± 0.4	10.8 ± 0.7	0.425
Obesity Lee index	347 ± 4	352 ± 3	352 ± 3	0.551
Daily food intake (g)	29.0 ± 0.6	28.1 ± 0.6	27.3 ± 0.8	0.252
Total cholesterol (mg/dL)	262 ± 13	255 ± 10	220 ± 7*	0.030
Serum triglyceride (mg/dL)	222 ± 13	164 ± 12*	130 ± 13*	0.021

Data are mean ± SEM of eight to nine animals per group. * $P < 0.05$ compared with acarbose-untreated animals.

Rats were fed *ad libitum* for 3 months with standard laboratory chow containing an amount of acarbose as indicated. During the last two weeks of treatment food intake was assessed as indicated in Methods. At the end of the treatment, fasting blood glucose and cholesterol were determined and serum samples were obtained for the determination of insulin, triglyceride, leptin and adiponectin, as described in the Methods. Visceral fat was weighed to estimate adiposity and naso-anal length was measured to evaluate the Lee index.

RESULTS

All animals showed increased bodyweight after 3 months, regardless of the treatment group to which they had been assigned (Tables 1,2). Treatment with the two different doses of acarbose did not result in a lower bodyweight gain than that observed in the control group (Table 2). In agreement with our previous report,¹⁷ after 3 months, in the absence of acarbose, WDF rats showed a slightly lower fasting blood glucose concentration and a marked increase in serum insulin, suggesting that they had developed insulin resistance (Tables 1,2). In contrast, in both groups of rats treated with acarbose, fasting blood glucose decreased and the increment in serum insulin was lower than that observed in control rats (Tables 1,2). Table 2 also shows that acarbose treatment with the two doses results in significantly lower blood glucose concentrations in the presence of lower serum insulin levels than in the control group, indicating an improvement of glycaemic control and a higher insulin sensitivity compared with the control group.

Acarbose treatment also resulted in lower levels of serum triglyceride and cholesterol. Both doses of acarbose were effective in decreasing serum triglyceride levels (Table 2), whereas untreated rats showed triglyceride concentrations similar to those reported previously for WDF rats.¹⁷ With regard to cholesterol levels, acarbose was effective in keeping the cholesterol concentration at a level similar to that characteristic of WDF rats aged 4 months.¹⁷ Nevertheless, only at the highest dose of acarbose was a significant effect observed (Table 2).

Table 2 also shows that treatment with both doses of acarbose resulted in lower concentrations of circulating leptin and an increase in the level of serum adiponectin. These changes were not associated

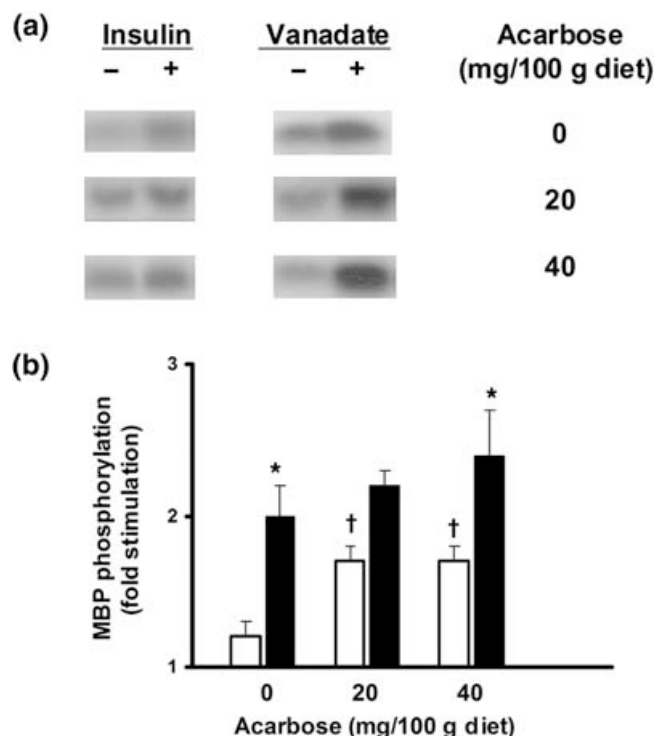


Fig. 1 Effect of acarbose on adipocyte mitogen-activated protein kinase (MAPK) stimulation by insulin and vanadate. Isolated adipocytes were pre-incubated for 5 min in the presence or absence of 16 nmol/L insulin or 1 mmol/L vanadate. Phosphorylation of myelin basic protein (MBP) by anti-MAPK immunoprecipitates from cytosolic extracts was determined as described in the Methods. (a) Phosphorylation of MBP. A representative autoradiogram from five separate experiments is shown. (b) Phosphate incorporation into MBP was quantified by scanning densitometry of the autoradiograms. Data show the fold stimulation of MBP phosphorylation by insulin (□) or vanadate (■) and are expressed as the mean ± SEM. Using ANOVA, a significant effect of acarbose on insulin stimulation was found ($P = 0.005$). * $P < 0.05$ compared with the effect of insulin at the same dose of acarbose; † $P < 0.01$ compared with the effect of insulin in adipocytes from rats not treated with acarbose.

with significant variations in the amount of visceral fat, as indicated by the similar adiposity index observed in all three groups of rats (Table 2). Furthermore, the obesity Lee index was not modified by the administration of acarbose and no significant effect of the drug on daily food intake was observed (Table 2).

In order to test whether the effects of acarbose on glycaemic and lipidic control, overall insulin sensitivity and leptin and adiponectin serum concentrations are paralleled by changes in adipocyte insulin signalling, we determined MAPK activity and phosphorylation of Akt using saturating concentrations of insulin and vanadate in isolated fat cells. Adipocytes from animals not fed acarbose showed poor stimulation by insulin of both MAPK activity (Fig. 1) and Akt phosphorylation (Fig. 2), in agreement with previous observations in other models of insulin resistance.^{22,23} The administration of acarbose at the two doses significantly increased the effect of insulin on adipocyte MAPK activity (up to approximately 1.7-fold; Fig. 1b). In contrast, the effect of insulin on Akt phosphorylation increased up to 2.5-fold, but this effect was only observed with the highest dose of acarbose (Fig. 2b). Figure 1 also shows that the insulin-mimetic

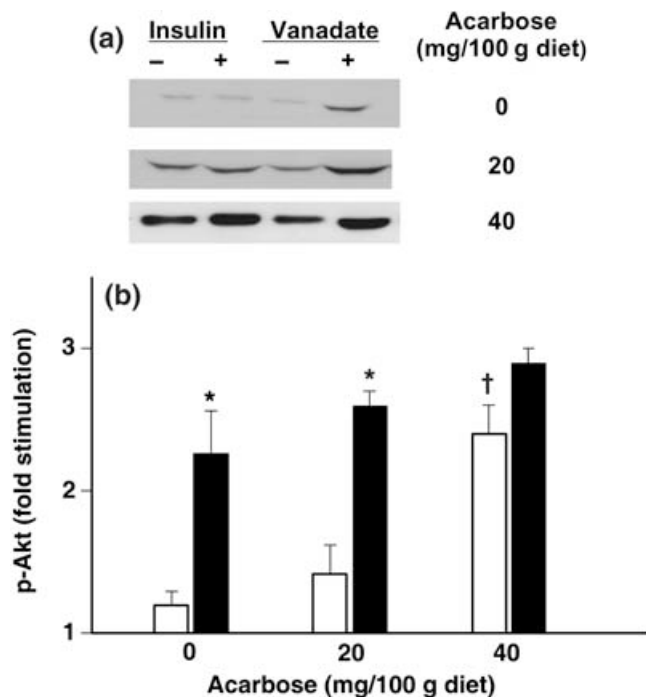


Fig. 2 Effect of acarbose on adipocyte Akt phosphorylation stimulation by insulin and vanadate. Isolated adipocytes were pre-incubated for 5 min in the presence or absence of 16 nmol/L insulin or 1 mmol/L vanadate. Phosphorylation of Akt was determined in cytosolic extracts by western blot with anti-phospho-Akt (Ser473)-specific antibodies, as described in the Methods. (a) Representative immunoblot of phosphorylated (p)-Akt from four to five separate experiments. (b) Scanning densitometry of the immunoblots was used to quantify p-Akt. Data show the fold stimulation of Akt phosphorylation by insulin (□) or vanadate (■) and are expressed as the mean \pm SEM. Using ANOVA, a significant effect of acarbose on insulin stimulation was found ($P = 0.006$). * $P < 0.05$ compared with the effect of insulin at the same dose of acarbose; † $P < 0.05$ compared with the effect of insulin in adipocytes from rats not treated with acarbose.

agent vanadate elicited a slightly, albeit significant, higher effect than insulin on MAPK activity (greater than twofold) and this effect is observed in adipose cells from animals treated either without or with acarbose. With regard to the phosphorylation of Akt, vanadate elicited a 2.3–2.8-fold stimulation in rats treated without or with acarbose, this effect being similar to that of insulin in animals only fed the highest dose of acarbose (Fig. 2).

In order to test whether the observed changes in plasma leptin in the absence of changes in adiposity and daily food intake may be the result of an improvement of hypothalamic leptin sensitivity following acarbose treatment, we analysed the presence of NPY in the arcuate nucleus in the three groups of animals. Figure 3 shows that 3 months treatment with two different doses of acarbose induced a significant decrease in the amount of NPY in the arcuate nucleus.

DISCUSSION

Confirming our previous report on WDF rats,¹⁷ the data from the present study show that 3 months of acarbose treatment induces a decrease in fasting blood glucose and insulin concentrations, indicating an improvement of glycaemic control and overall insulin

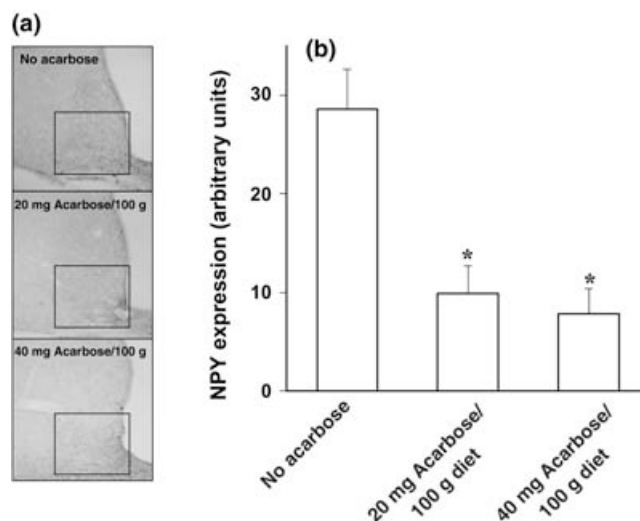


Fig. 3 Neuropeptide Y (NPY) immunoreactivity in arcuate nucleus. (a) Representative frontal sections from animals treated with or without 20 and 40 mg acarbose/100 g diet. Immunoreactions were performed using a polyclonal anti-NPY antiserum, as described in the Methods. The pattern was reproduced in five to six rats per group. Images correspond to an original magnification of $\times 10$. The squares on each image indicate the area used for quantification. A control section stained with rabbit pre-immune serum was analysed in each case (data not shown). (b) Neuropeptide Y expression was quantified as described in the Methods. Data are expressed in arbitrary units and are the mean \pm SEM of five to six rats per group. Using ANOVA, a significant effect of acarbose on NPY expression was found ($P = 0.0016$). * $P < 0.01$ compared with acarbose-untreated animals.

sensitivity compared with control, acarbose-untreated rats. Moreover, the data from the present study further indicate that acarbose treatment contributes to decreases in the elevated hypertriglyceridaemia of obese WDF rats.¹⁷ In addition, the data reported herein show that the highest dose of acarbose prevents the increase in total cholesterol, confirming its beneficial effect on the lipid profile.

Changes in overall insulin sensitivity should reflect alterations in insulin action in target tissues of the hormone. Previous work in obese mice¹⁵ did not find changes in soleus muscle insulin sensitivity after acarbose treatment. In contrast, in obese Zucker rats, 3 months of acarbose treatment resulted in the normalization of insulin-mediated Akt phosphorylation and GLUT-4 translocation to the plasma membrane of soleus and cardiac muscle.¹⁶ The present results indicate that, in WDF rats, treatment with acarbose for 3 months induces the amelioration of insulin responsiveness of isolated adipocytes, as indicated by the higher stimulation of MAPK activity and Akt phosphorylation by insulin. With regard to MAPK activity, this higher insulin stimulation is observed at the lowest dose of acarbose used without a further increase at higher doses, whereas for insulin-mediated Akt phosphorylation, a key step in the physiological effects of insulin, higher stimulation is observed only at the higher dose of acarbose used, indicating that the two signalling pathways show differential sensitivity to acarbose. The insulin-mimetic vanadate stimulates MAPK activity and Akt phosphorylation in adipocytes from rats that were not fed acarbose. Nevertheless, in contrast with the effects of insulin, the administration of the glucosidase inhibitor does not result in a significant increase of the stimulatory

effect of vanadate either on MAPK activity or Akt phosphorylation. Vanadate stimulates the insulin signalling pathway in adipocytes increasing insulin receptor substrate-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity, without inducing tyrosine phosphorylation and subsequent activation of insulin receptor kinase.^{21,26} Thus, it can be postulated that acarbose treatment increases the stimulation by insulin at an early step of the insulin signalling cascade, probably the autophosphorylation of the insulin receptor. In cells from animals treated with 40 mg acarbose/100 g diet, the effect of insulin on Akt phosphorylation was similar to that elicited by vanadate, indicating that acarbose improves only an early insulin signalling step, upstream of the point of convergence of the insulin and vanadate signalling pathways. Interestingly, with regard to MAPK activity, the maximal insulin effect remains lower than the effect of vanadate. Because vanadate is an effective phosphatase inhibitor, it seems likely that it may have an additional direct effect on MAPK activity by inhibiting the dephosphorylation and inactivation of the MAPK pathway. It should also be pointed out that the stimulation of MAPK activity and Akt phosphorylation by insulin in adipose cells from acarbose-treated rats is lower than that observed in insulin-stimulated fat cells from 3-month-old Wistar rats,^{22,23} suggesting that acarbose treatment only partially reverts the insulin resistance of adipocytes from WDF rats.

Because adipose tissue seems to play a key role in the development of insulin resistance,¹⁹ the effect of acarbose on adipocyte insulin responsiveness could explain, at least in part, the observed improvement in overall insulin sensitivity in WDF rats after 3 months of acarbose treatment. Nevertheless, acarbose is not able to fully revert overall insulin resistance, as indicated by the still high levels of circulating insulin, in agreement with the partial effect of acarbose treatment on adipocyte insulin signalling.

The present data also show that acarbose treatment induces changes in serum concentrations of leptin and adiponectin, two adipokines that have been shown to modulate insulin sensitivity.^{27,28} The leptin concentration is extremely high in WDF rats, suggesting the presence of leptin resistance. Acarbose treatment keeps the serum concentration of leptin significantly lower than in untreated rats, but leptin levels remain markedly higher than in 24-month-old Wistar rats,²⁹ which also show central leptin resistance.^{18,24} Even at the leptin levels observed in acarbose-treated animals, we have shown previously that isolated adipocytes become insulin resistant.¹⁸ Thus, it seems unlikely that the observed lower serum leptin concentration could, by itself, explain the improved insulin sensitivity of adipocytes from acarbose-treated WDF rats.

Obesity and type 2 diabetes have been associated with low levels of circulating adiponectin and a strong correlation between adiponectin and overall insulin sensitivity has been well established.²⁸ However, the concentration of adiponectin observed in WDF rats is similar to that of lean 3-month-old Wistar rats,³⁰ which show normoglycaemia and normoinsulinaemia and are insulin sensitive. Thus, the insulin resistance of WDF rats does not seem to be due to hypoadiponectinaemia. Nevertheless, serum adiponectin increases significantly in acarbose-treated WDF rats. Therefore, it can be postulated that the improved insulin sensitivity observed in acarbose-treated rats is the consequence, at least in part, of the increased adiponectinaemia that promotes fat mobilization and oxidation in liver and skeletal muscle.²⁸ This is in agreement with our data on decreased serum triglyceride and free fatty acids after 3 months of acarbose treatment reported herein and previously.¹⁷

Adiponectin R1 and R2 receptors have been identified in white adipose tissue, but their precise roles have not been elucidated.³¹ Therefore, it is not possible, at this moment, to allege that changes in adipocyte insulin sensitivity after acarbose treatment are due to the increased level of circulating adiponectin. Secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes has been reported to be dependent on functional insulin signalling.³² Thus, it is tempting to speculate that acarbose induces higher adipocyte insulin signalling, which brings about higher adiponectin secretion, leading, in turn, to better insulin action in liver and skeletal muscle and to the improvement of overall insulin sensitivity. Although weight reduction in humans has been reported to parallel an increase in adiponectinaemia,³³ the increase in serum adiponectin after acarbose treatment reported herein is associated with neither a decrease in bodyweight nor with changes in adiposity and Lee obesity indices. This suggests that increases in adiponectin may take place and lead to changes in insulin sensitivity without associated changes in bodyweight.

As mentioned above, the present data show that acarbose treatment elicits a decrease in serum leptin concentration in the absence of a reduction in the amount of visceral fat compared with untreated animals. This suggests that acarbose could improve central leptin sensitivity. Here, we do not observe differences in bodyweight between WDF rats treated or not treated with acarbose, although a small, but non-significant, decrease in food intake was observed. Nevertheless, a marked decrease in NPY levels in the arcuate nucleus were found in acarbose-treated animals, despite lower circulating leptin levels, a fact that indicates that leptin may suppress more efficiently the expression of the orexigenic NPY. That the decrease in hypothalamic NPY does not result in a significant decrease in food intake suggests that other neuropeptides involved in the complex mechanisms that regulate appetite are also modified following acarbose treatment. Several reports have demonstrated that, in humans, α -glucosidase inhibitors like voglibose,³⁴ acarbose³⁵ and miglitol³⁶ promote a sustained enhancement of post-prandial glucagon-like peptide secretion, an incretin released from the lower gastrointestinal tract that acts physiologically to mediate satiety at regulatory brain centres by mechanisms that are not completely understood.³⁷ Thus, it remains possible that acarbose regulates central leptin action and arcuate NPY expression in WDF rats through a mechanism involving glucagon-like peptide (GLP)-1.

In summary, the data reported here show that prolonged administration of acarbose results in a partial amelioration of glycaemic control and lipid profile and the increase of adipocyte insulin responsiveness in WDF rats. Serum adiponectin also increases in acarbose-treated animals, a fact that could be related to the higher overall insulin sensitivity observed in these rats. In addition, we report, for the first time, an effect of acarbose on NPY expression in the hypothalamic arcuate nucleus, indicating that acarbose can regulate the gut-brain cross-talk involved in the control of energy homeostasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants BFI2002-04030 and BFU2005-07647 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain), 08.6/0009/2001 (Comunidad de Madrid, Spain) and by Química Farmacéutica Bayer (Spain). The Centro de Biología Molecular is the recipient of institutional aid from the Ramón Areces Foundation. CP is a recipient of a fellowship from the Mutis Program (Spain).

REFERENCES

- Jenkins DJ, Taylor RH, Goff DV *et al.* Scope and specificity of acarbose in slowing carbohydrate absorption in man. *Diabetes* 1981; **30**: 951–4.
- Clissold SP, Edwards C. Acarbose. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs* 1988; **35**: 214–43.
- Hanefeld M, Fischer S, Schulze J *et al.* Therapeutic potentials of acarbose as first-line drug in NIDDM insufficiently treated with diet alone. *Diabetes Care* 1991; **14**: 732–7.
- Rachmani R, Bar-Dayana Y, Ronen Z, Levi Z, Slavachevsky I, Ravid M. The effect of acarbose on insulin resistance in obese hypertensive subjects with normal glucose tolerance: A randomized controlled study. *Diabetes Obes. Metab.* 2004; **6**: 63–8.
- Chiasson JL, Josse RG, Leiter LA *et al.* The effect of acarbose on insulin sensitivity in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 1996; **19**: 1190–3.
- Pan CY, Gao Y, Chen JW *et al.* Efficacy of acarbose in Chinese subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2003; **61**: 183–90.
- Reaven GM, Lardinois CK, Greenfield MS, Schwartz HC, Vreman HJ. Effect of acarbose on carbohydrate and lipid metabolism in NIDDM patients poorly controlled by sulfonylureas. *Diabetes Care* 1990; **13** (Suppl. 3): 32–6.
- Jenney A, Proietto J, O'Dea K, Nankervis A, Traianedes K, D'Embden H. Low-dose acarbose improves glycemic control in NIDDM patients without changes in insulin sensitivity. *Diabetes Care* 1993; **16**: 499–502.
- Holman RR, Cull CA, Turner RC on behalf of the UKPDS Study Group. A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care* 1999; **22**: 960–4.
- Josse RG, Chiasson JL, Ryan EA *et al.* Acarbose in the treatment of elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2003; **59**: 37–42.
- Phillips P, Karrasch J, Scott R, Wilson D, Moses R. Acarbose improves glycemic control in overweight type 2 diabetic patients insufficiently treated with metformin. *Diabetes Care* 2003; **26**: 269–73.
- Fischer S, Patzak A, Rietzsch H *et al.* Influence of treatment with acarbose or glibenclamide on insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Obes. Metab.* 2003; **5**: 38–44.
- Hwu CM, Ho LT, Fuh MM *et al.* Acarbose improves glycemic control in insulin-treated asian type 2 diabetic patients: Results from a multinational, placebo-controlled study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2003; **60**: 111–18.
- Delgado H, Lehmann T, Bobbioni-Harsch E, Ybarra J, Golay A. Acarbose improves indirectly both insulin resistance and secretion in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab.* 2002; **28**: 195–200.
- Le Marchand-Brustel Y, Rochet N, Gremeaux T, Marot I, Van Obberghen E. Effect of an alpha-glycosidase inhibitor on experimentally-induced obesity in mice. *Diabetologia* 1990; **33**: 24–30.
- Ledwig D, Müller H, Bischoff H, Eckel J. Early acarbose treatment ameliorates resistance of insulin-regulated GLUT4 trafficking in obese Zucker rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; **445**: 141–8.
- Carrascosa JM, Molero JC, Fermin Y, Martínez C, Andrés A, Satrustegui J. Effects of chronic treatment with acarbose on glucose and lipid metabolism in obese diabetic Wistar rats. *Diabetes Obes. Metab.* 2001; **3**: 240–8.
- Pérez C, Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T *et al.* Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 2004; **53**: 347–53.
- Smith U. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance: Is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int. J. Obes.* 2002; **26**: 897–904.
- Ikeda H, Shino A, Matsuo T, Iwatsuka H, Suzuoki Z. A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar Fatty). *Diabetes* 1981; **30**: 1045–50.
- Molero JC, Martínez C, Andrés A, Satrustegui J, Carrascosa JM. Vanadate fully stimulates insulin receptor substrate-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in adipocytes from young and old rats. *FEBS Lett.* 1998; **425**: 298–304.
- Molero JC, Pérez C, Martínez C *et al.* Activation of MAP kinase by insulin and vanadate in adipocytes from young and old rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; **189**: 77–84.
- Villar M, Serrano R, Gallardo N, Carrascosa JM, Martínez C, Andrés A. Altered subcellular distribution of IRS-1 and IRS-3 is associated with defective Akt activation and GLUT4 translocation in insulin-resistant old rat adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; **1763**: 197–206.
- Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Pérez C *et al.* Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia* 2002; **45**: 997–1003.
- Li H, Matheny M, Nicolson M, Tümer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 1997; **46**: 2035–9.
- Shechter Y. Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. *Diabetes* 1990; **39**: 1–5.
- Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 2002; **16**: 1163–76.
- Chandran M, Philips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: More than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; **26**: 2442–50.
- Peralta S, Carrascosa JM, Gallardo N, Ros M, Arribas C. Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: Effects of food restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; **296**: 425–8.
- Escrivá F, Gavete ML, Fermin Y *et al.* Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats. Role of adiposity. *J. Endocrinol.* 2007; **194**: 131–41.
- Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y *et al.* Insulin/Foxo 1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 30 817–22.
- Bogan JS, Lodish HF. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J. Cell Biol.* 1999; **146**: 609–20.
- Yang WS, Lee WJ, Funahashi T *et al.* Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; **86**: 3815–19.
- Goke B, Fuder H, Wieckhorst G *et al.* Voglibose (AO-128) is an efficient alpha-glucosidase inhibitor and mobilizes the endogenous GLP-1 reserve. *Digestion* 1995; **56**: 493–501.
- Ranganath L, Norris F, Morgan L, Wright J, Marks V. Delayed gastric emptying occurs following acarbose administration and is a further mechanism for its anti-hyperglycaemic effect. *Diabet. Med.* 1998; **15**: 120–4.
- Lee A, Patrick P, Wishart J, Horowitz M, Morley JE. The effects of miglitol on glucagon-like peptide-1 secretion and appetite sensations in obese type 2 diabetics. *Diabetes Obes. Metab.* 2002; **4**: 329–35.
- Schick RR, Zimmermann JP, Walde T, Schusdziaara V. Peptides that regulate food intake. Glucagon-like peptide 1-(7-36) amide acts at lateral and medial hypothalamic sites to suppress feeding in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; **284**: R1427–35.

Impaired Central Insulin Response in Aged Wistar Rats: Role of Adiposity

Miriam García-San Frutos, Teresa Fernández-Agulló, Alain J. De Solís, Antonio Andrés, Carmen Arribas, José M. Carrascosa, and Manuel Ros

Facultad de Ciencias de la Salud (M.G.-S.F., T.F.-A., M.R.), Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, 28922 Madrid, Spain; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (A.J.D.S., J.M.C.), Universidad Autónoma de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain; and Área de Bioquímica (A.A., C.A.), Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Castilla-La Mancha, 13003 Ciudad Real, Spain

Insulin, like leptin, is considered as a lipostatic signal acting at a central level. Aging and age-associated adiposity have been related to the development of leptin resistance in Wistar rats. In the present article, hypothalamic insulin response during aging has been studied in Wistar rats. Thus, the effects of intracerebroventricular infusion of insulin during a week on food intake and body weight as well as insulin signal transduction after acute intracerebroventricular insulin administration have been studied in 3-, 8-, and 24-month-old rats. To explore the possible role of age-associated adiposity, these experiments were also performed in 8- and 24-month-old rats after 3 months of food restriction to reduce visceral adiposity index to values below those of young animals. Intracerebroventricular administration of insulin during a week was more

efficient at reducing food intake and body weight in 3-month-old rats than in 8- and 24-month-old rats. Hypothalamic insulin-stimulated insulin receptor, GSK3, AKT, and p70S6K phosphorylation decreased with aging. Insulin receptor and IRS-2 phosphoserine was increased in 24-month-old rats. Food restriction improved both insulin responsiveness and insulin signaling. These data suggest that Wistar rats develop hypothalamic insulin resistance with aging. This can be explained by alterations of the signal transduction pathway. The fact that food restriction improves central insulin response and signal transduction points to the age-associated adiposity as a key player in the development of central insulin resistance. (*Endocrinology* 148: 5238–5247, 2007)

WOODS ET AL. (1) demonstrated the ability of insulin, acting at a central level, to decrease food intake in baboons and proposed a lipostatic role for this hormone. The expression of its receptor and the different elements of its signal transduction pathway in hypothalamic nuclei, the activation of this machinery by insulin and the effects of central administration of insulin on food intake and body weight in different animal models are data that now clearly support its lipostatic role acting at a central level (2). Insulin shares some of the hypothalamic targets of leptin (3, 4), and there is evidence concluding that these signals also share some signal transduction steps such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), suggesting the existence of cross talk between them (2, 4, 5). The effects of leptin at the central level on food intake and energy balance seem to be more efficient than those of insulin. Nevertheless, the data obtained in mice with a neuron-specific disruption of the IR gene, which present diet-sensitive obesity and

mild insulin resistance, among other alterations (6), clearly demonstrates the importance of insulin as an energy balance regulator, acting through the central nervous system. Thus, any alteration in any of the multiple steps involved in insulin signaling at the central level may have consequences in the control of both glucose homeostasis and energy balance.

Wistar rats, like humans and other rodent models, present a moderate increase in adiposity during aging and exhibit overall insulin resistance in the absence of changes in fasting plasma glucose and insulin concentrations (7, 8). Besides this peripheral insulin resistance, these animals also present age-associated central leptin resistance (9). A decrease in the expression of leptin receptor in hypothalamic nuclei together with an increase in suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) expression (9, 10) have been pointed out to be related with the above mentioned central leptin resistance associated with aging in these animals (9). In the present article, we have studied whether central insulin action is affected by aging in Wistar rats. The fact that central leptin resistance associated with aging in these animals is ameliorated by a food restriction protocol enough to decrease adiposity index to values below those of young animals (9) also led us to investigate the effects of the same food restriction protocol on central insulin action and the possible role of age-associated adiposity.

Materials and Methods

Experimental animals

The 3-, 8-, and 24-month-old male Wistar rats from our in-house colony (Centre of Molecular Biology, Madrid, Spain) were used through-

First Published Online August 2, 2007

Abbreviations: AKT, Protein kinase B/thymoma viral proto-oncogene; Foxo-1, forkhead transcription factor-1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GSK3, glycogen synthase kinase-3; icv, intracerebroventricular; HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance; IR, insulin receptor; IRS-2, insulin receptor substrate-2; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; p70S6K, p70 ribosomal S6 kinase; PVDF, polyvinylidene difluoride; SOCS-3, suppressor of cytokine signaling-3.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

genous 1,25(OH)₂D₃. In contrast, detrimental effect of atorvastatin on insulin sensitivity was not abolished by concomitant administration of exogenous vitamin D₃ at doses which restored plasma 25(OH)D₃ level to values observed in the control group.

Conclusions: (1) pravastatin and atorvastatin have opposite effects on vitamin D metabolites and insulin sensitivity, (2) pravastatin improves insulin sensitivity by increasing 1,25(OH)₂D₃ concentration, (3) detrimental effect of atorvastatin on insulin sensitivity is independent of its reducing influence on 25(OH)D₃.

LEPTIN IMPAIRS INSULIN ACTION ACTING DIRECTLY ON RAT SKELETAL MUSCLE

A.J. De Solis, P. Perez-Pardo, E. Bogonez, J.M. Carrascosa

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), Madrid, Spain

Wistar rats develop whole body insulin resistance and hyperleptinemia during ageing. Although leptin exerts an insulin-sensitizing effect on muscle acting through the hypothalamus, aged rats show central leptin resistance. We speculate that elevated leptin could inhibit insulin action acting directly on muscle in aged rats. To study that we analyzed insulin action in soleus muscle from 3-, 8- and 24-month old Wistar rats fed *ad libitum*, and 8- and 24-month old rats under moderate caloric restriction (CR) during three months. Here we determine: 1) *in vivo* insulin signalling after i.v injection and 2) insulin-dependent 2-deoxyglucose (2-DOG) uptake in isolated muscle strips. The effect of leptin pre-treatment on insulin action was also explored.

Insulin-induced *in vivo* phosphorylation of IRβ, IRS-1 and AKT, and *ex vivo* 2-DOG uptake, decreases with ageing. Leptin induces AMPK phosphorylation and 2-DOG uptake, but to a lesser extent than insulin. These effects also show an age-dependent decrease. CR restores the sensitivity to insulin and leptin in 8-month, but not in 24-month, old animals. Pretreatment with leptin results in the inhibition of insulin-dependent phosphorylation of IRβ, IRS-1 and AKT, as well as the stimulation of 2-DOG uptake in 3-month old and 8-month old under CR animals.

These results show that high dose of leptin has a moderate effect over the insulin signalling *in vivo* and could impair the glucose uptake. These suggest that hyperleptinemia could impair insulin action on soleus muscle and contribute to the development and maintenance of insulin resistance in skeletal muscle at advanced age.

SYNERGISTIC INDUCTION OF INSULIN RESISTANCE BY ENDOTHELIN-1 AND CYCLIC AMP IN 3T3-L1 ADIPOCYTES. INVOLVEMENT OF INTERLEUKIN-6 RELEASE AND HIGH GLUCOSE UPTAKE

J.C. Fong, S.-P. Chai

Institute of Biochemistry and Molecular Biology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan R.O.C.

We have previously demonstrated that endothelin-1 (ET-1) may stimulate interleukin-6 (IL-6) release from 3T3-L1 adipocytes, probably via the same signaling pathway to induce glucose transporter GLUT1 expression. Since ET-1 and cAMP may act together to enhance GLUT1 expression in a synergistic manner (Cellular Signalling (2004) 16, 811–821), and IL-6 is well-known for inducing insulin resistance, we have further examined the combined effect of ET-1 and cAMP on IL-6 release and insulin signaling in the present study. Our experimental data indicated that ET-1 and cAMP may induce both IL-6 release and insulin resistance in a synergistic manner. IL-6 release seemed to play an essential role, since inhibition of insulin-stimulated glucose transport by ET-1 and cAMP was reversed in the presence of neutralizing anti-IL-6 antibody. Further investigation showed that insulin resistance induced by ET-1 and cAMP was ameliorated if glucose concentration in the incubation medium was changed from 25 mM to 5.5 mM, albeit IL-6 release was not altered. Taken together, we have

demonstrated that ET-1 and cAMP may act synergistically to induce insulin resistance and both enhanced IL-6 release and glucose uptake seem to be involved.

BAROREFLEX SENSITIVITY - INSULIN RESISTANCE CROSS-TALKING BY MICROVASCULAR DYSFUNCTION, POTENTIAL ROLE IN METABOLIC SYNDROME, WAYS OF TREATMENT

J. Gmitrov^{1,2}

¹*National Institute of Public Health, Tokyo, Japan,*

²*Pro Vitae Hospital, Gelnica, Slovak Republic*

Objectives: Increasing evidence suggests impairment of arterial baroreflex cardiovascular regulation even in prediabetic conditions. We studied baroreflex-mediated blood pressure (BP) buffering and microcirculatory control after sinocarotid baroreceptor stimulation by static magnetic field (SMF) with regard to potential implementation in metabolic syndrome.

Methods: Mean femoral artery BP, heart rate (HR), and ear lobe skin microcirculatory blood flow, measured by microphotoelectric plethysmogram (MPPG), were simultaneously recorded in rabbits sedated by pentobarbital infusion (5 mg kg⁻¹ hour⁻¹) before and after a 40 min local exposure of the sinocarotid baroreceptors to 350 mT intensity SMF, generated by Nd-Fe-B alloy magnets (n = 14) or sham magnets (n = 10, control series). Arterial baroreflex sensitivity (BRS) was estimated from HR/BP response to i.v. bolus injections of nitroprusside and phenylephrine.

Results: SMF induced a significant decrease in phenylephrine ΔBP ramps (-21.9%), which inversely correlated with significant increase in ΔBRS (r=0.47, P < 0.016). A positive correlation between SMF-induced significant increase in microcirculatory blood flow ΔMPPG and in ΔBRS (r = 0.66, P < 0.009) indicates baroreflex participation in the microcirculatory control and its enhancement after SMF exposure.

Conclusion: Sinocarotid baroreceptor stimulation may be a potential method how to improve dysregulation of the autonomic microcirculatory control, tissue perfusion, whole body insulin resistance, and insulin resistance in brain, which in turn may reinforce the cross-talk performance between central baroreflex microcirculatory control and a vascular component of insulin resistance. The clustering of improved microcirculatory control with enhanced BP buffering may counteract metabolic syndrome, generating additional synergetic cardiovascular benefit.

REACTIVE OXYGEN SPECIES CAUSE HYPERTENSION IN FRUCTOSE-FED RATS BY INDUCING NEURONAL INSULIN RESISTANCE IN THE NUCLEUS TRACTUS SOLITARIUS THROUGH ACTIVATED P38

C.-J. Tseng¹, B.-R. Chen¹, L.-P. Ger¹, W.-Y. Ho²

¹*Department of Medical Education and Research, Kaohsiung Veterans General Hospital, Kaohsiung, Taiwan,* ²*Division of Nephrology, Zuoying Armed Forces General Hospital, Kaohsiung, Taiwan R.O.C.*

Insulin resistance was thought as the major etiology of hypertension of the metabolic syndrome. Our previous study demonstrated that insulin plays a cardiovascular regulatory role in the nucleus tractus solitarius (NTS). Recently, it was reported that IRS1^{S307} phosphorylation inhibited normal insulin signal transduction and increased oxidative stress, which raise the risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases. The aims of this study are to investigate whether the neuronal cells in the NTS will develop insulin resistance and induce hypertension through active phosphorylation of p38MAPK by ROS in the metabolic syndrome rats. In our study, Wistar-Kyoto (WKY) rats were fed with 10% fructose water as their drinking water for 2 weeks. Another group of fructose-fed WKY rats were fed with insulin sensitizer, rosiglitazone, and antioxidant, Tempol, since the 2th week. These

**ABSTRACT Cell symposia: Metabolism & Aging.
March 27-29, 2011. Cape Cod. Massachusetts, USA**

Interaction of leptin and insulin signalling in Wistar rat skeletal muscle: Role of aging and adiposity.

De Solis AJ, Perez-Pardo P, Bogonez E, Carrascosa JM.
Centro Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC). Universidad Autónoma de Madrid, SPAIN.

Topic: Physiology & aging.

Wistar rats develop whole body insulin resistance and hyperleptinemia during aging. Although leptin exerts an insulin-sensitizing effect on skeletal muscle (SM) acting through the hypothalamus, aged rats show central leptin resistance. Since insulin action declines with aging, we speculate that hyperleptinemia could impair insulin action on SM as a result of a direct action on muscle. To study that, we analyze the insulin and leptin action on SM from 3-, 8- and 24-month old rats fed *ad libitum* and 8- and 24-month old rats under moderate caloric restriction (CR) protocol during 3 months. Here we determine: 1) *in vivo* insulin signalling after *i.v* injection and 2) glucose uptake in isolated muscle strips. The effect of leptin pre-treatment was also analyzed.

Insulin-induced *in vivo* phosphorylation of IRbeta, IRS-1 and AKT, and *ex vivo* glucose uptake decrease with ageing. Leptin induces AMPK phosphorylation and glucose uptake, but to a lesser extent than insulin. These effects also show an age-dependent decrease. CR restores the sensitivity to insulin and leptin in 8-month, but not in 24-month old animals. Pretreatment with leptin results in the inhibition of insulin-dependent phosphorylation of IRbeta, IRS-1 and AKT, and in the impairment of insulin-induced glucose uptake in 3-month old and 8-month old under CR animals.

These results show that high dose of leptin has a moderate inhibitory effect over SM insulin signalling *in vivo* and could impair the insulin-induced glucose uptake. These suggest that hyperleptinemia could alter insulin action and contribute to the development and maintenance of insulin resistance in SM at advanced age.

P03.50 - Insulin signalling in peripheral tissues

ANALYSIS OF INSULIN SENSITIVITY IN P66SHCA KO MICE BY HYPERINSULINEMIC EUGLYCEMIC CLAMP

Sorice Gianpiero², Chiatamone Ranieri Sofia¹, Muscogiuri Giovanna², Pani Giovanni¹, Giaccari Andrea²

¹Institute Of General Pathology, Rome, Italy; ²Division Of Endocrinology, Rome, Italy

Emerging clinical and experimental evidences point to a major role of tissue oxidative stress in linking ageing and excess body weight with insulin resistance (IR); molecular mechanism underlying this connection are however still elusive. The signaling adaptor protein p66shcA promotes mitochondrial generation of oxidant species in several models of age-related disease, and p66KO mice live 30% longer than their WT littermates; thus, this molecule may represent a critical determinant of the intracellular redox-state imbalance associated with diabetes. We have previously shown that genetically obese, hyperinsulinemic (LepOb/Ob) mice lacking p66shcA are partially protected from glucose intolerance observed in their p66shcA proficient littermates (Chiatamone et al., submitted), demonstrating that p66shcA promotes IR in this setting. However, no major effects of p66shcA on glucose homeostasis were detected in normal, lean mice by standard ipGTT, (1g glucose/Kg BW) and insulin tolerance test (0.75 U/Kg BW). Prompted by this discrepancy we have set up and performed hyperinsulinemic euglycemic clamp (18 mUI·kg⁻¹·min⁻¹) on lean mice of the two genotypes. This more reliable assay clearly demonstrated an enhanced insulin sensitivity in p66shcA^{-/-} vs. WT mice (glucose infusion rates during the clamp \pm SEM: respectively 161 mg·kg⁻¹·min⁻¹, \pm 35; 66 mg·kg⁻¹·min⁻¹, \pm 4.4; $p < 0.02$). In keeping with this finding, biochemical analysis of the insulin signalling pathway in the adipose tissue of p66shcA null mice demonstrated reduced serine phosphorylation (serine307 + serine636-639) of IRS-1, an hallmark of insulin desensitization. These findings confirm and extend our observation that p66shcA participates in the regulation of insulin action in an hyperinsulinemic setting, as it occurs in ageing-associated metabolic disorders including obesity and metabolic syndrome. While the possible connection between p66-dependent oxidative stress and IR needs to be further investigated, our data strongly encourage pharmacological research aimed at blocking the deleterious effect of the p66shcA protein to improve glucose homeostasis and prevent type 2 diabetes.

P03.51 - Insulin signalling in peripheral tissues

DIRECT EFFECT OF HYPERLEPTINEMIA ON INSULIN ACTION IN WISTAR RAT SKELETAL MUSCLE

De Solis Alain J.¹, Perez-Pardo Paula¹, Bogonez Elena¹, Carrascosa Jose M.¹

¹Centro Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), UAM-CSIC, Universidad Autónoma De Madrid (UAM), Madrid, Spain

Wistar rats develop hyperleptinemia and whole body insulin resistance during ageing. Here we study how hyperleptinemia influences directly insulin action on skeletal muscle (SM) during ageing and the effect of moderate caloric restriction (CR). Insulin action on oxidative (soleus) and non oxidative (EDL) SM was determined by analyzing: A) the insulin-induced 2-deoxyglucose (2-DOG) uptake in isolated muscles; and B) muscle insulin signalling after i.v. injection of leptin plus insulin. Studies were carried out on 3-, 8- and 24-months old rats fed ad libitum, and 8- and 24-months old animals after three months of CR. Insulin-induced 2-DOG uptake, phosphorylation of the insulin pathway (insulin receptor β , IRS-1, AKT) and p38MAPK phosphorylation decrease with ageing, mainly in soleus. Leptin also stimulates 2-DOG uptake and this effect decreases with ageing. However, leptin has no effect on the insulin pathway. CR restores ageing-associated effects on insulin and leptin signalling, but only in 8-month old rats. Pre-treatment with high doses of leptin decreases the insulin stimulation of 2-DOG uptake and the phosphorylation of the insulin pathway and p38MAPK in leptin sensitive muscles. These data indicate that leptin, acting directly in SM, might impair insulin action in contrast to its insulin-sensitizing effects elicited through the CNS. The results show that leptin has a moderate effect on the insulin-signalling pathway, and suggest that the blocking effect on insulin-induced glucose uptake could be mediated by the impairment of p38MAPK phosphorylation. We conclude that ageing-associated hyperleptinemia could contribute to the development of muscle insulin resistance.

P03.52 - Insulin signalling in peripheral tissues

PALMITATE INDUCES ER STRESS AND IMPAIRS INSULIN ACTION IN ISOLATED HUMAN SKELETAL MUSCLE

Skrobuk Paulina¹, Kärkkäinen Johannes¹, Koistinen Heikki A.¹

¹Department Of Medicine, Division Of Cardiology, Helsinki University Central Hospital And Minerva Research Institute, Helsinki, Finland

Obesity and high fat diet have been linked to insulin resistance, and may involve endoplasmic reticulum (ER) stress. Here, we studied the effect of acute palmitate exposure on insulin action on glucose transport (GT), glycogen synthesis, insulin signaling and ER stress. We studied 18 men (47 \pm 3 years, BMI 26.2 \pm 0.8 kg/m², fP-gluk 5.5 \pm 0.1 mM). Open muscle biopsy was obtained from m. vastus lateralis, and small muscle strips were incubated for 4 h with or without (w/o) palmitate (1mM), and with or w/o insulin (1.2 nM). Insulin increased GT (in nmol/mg protein/20 min) 1.9-fold (from 0.6 \pm 0.05 to 1.2 \pm 0.1, $p < 0.001$). With palmitate, basal GT tended to be increased (0.9 \pm 0.1, $p = 0.062$), insulin-stimulated GT was unchanged (1.2 \pm 0.1), and insulin action on GT (insulin-stimulated minus basal) reduced by 49 % ($p = 0.068$). Palmitate reduced insulin-stimulated glycogen synthesis 18 % (70 \pm 13 vs 85 \pm 15 nmol/g/h, $p < 0.02$), but did not affect AKT-Ser473 or AS160-phosphorylation. When men were divided by BMI, insulin increased GT with palmitate in lean, but not in overweight men. Similarly, when analyzed by glucose tolerance, insulin increased GT with palmitate in men with normal glucose tolerance, but not in men with impaired fasting glucose (IFG). This palmitate-induced defect was associated with blunted insulin-stimulated AS160-phosphorylation in muscle from IFG men. Palmitate induced ER stress (1.3-fold increased phosphorylation of eIF2 α) in overweight but not in lean men. Thus, acute exposure to palmitate impairs insulin action in human muscle strips. This effect is more pronounced in men with overweight or IFG, and may involve activation of ER stress.

pressure (SBP) measured in animals with anesthesia. The power of low-frequency (LF) and high-frequency (HF) oscillations was automatically quantified with each spectral peak by computing the residuals. The closed-loop baroreflex gain was estimated using the square root of the ratio between HR and SBP powers in the LF band (a_{LF}). Compared with the age-matched controls, the STZ-diabetic rats showed a significant decline in baroreflex gain, from 1.191 ± 0.158 to 0.641 ± 0.059 $\text{ms} \times \text{mmHg}^{-1}$ ($P < 0.005$) and a fall in the LF-to-HF power ratio of the heart period (LF/HF), from 1.524 ± 0.194 to 0.323 ± 0.050 ($P < 0.001$). After exposure to benfotiamine, the diabetic animals exhibited a beneficial effect on the baroreceptor-HR reflex sensitivity, as evidenced by the increase of 62.2% in a_{LF} ($P < 0.05$). Meanwhile, benfotiamine prevented the diabetes-induced disturbance in sympatho-vagal balance of the heart control, as reflected in the rise of 108.9% in LF/HF ($P < 0.05$). We conclude that benfotiamine ameliorates the diabetes-related deterioration in cardiac autonomic nervous system in the STZ-treated rats.

INVOLVEMENT OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 IN DOWN-REGULATION OF PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR IN EXPERIMENTAL DIABETIC NEPHROPATHY

K. Fukami¹, S.-I. Yamagishi², Y. Takamiya¹, S. Ueda¹, Y. Kaida¹, H. Tanaka¹, S. Okuda¹

¹Division of Nephrology, Department of Medicine, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan, ²Department of Pathophysiology and Therapeutics of Diabetic Vascular Complications, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

Background and aims: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties in diabetic nephropathy. Indeed, overexpression of PEDF was reported to alleviate microalbuminuria and reduce the production of an extracellular matrix protein in the diabetic kidney. Since PEDF is known to be a substrate for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), we investigated the role of PEDF and MMP-2 system in diabetic nephropathy.

Materials and methods: Nine wk-old Sprague-Dawley rats received intravenous injection of streptozotocin. After 16 weeks, MMP-2 expressions in the glomeruli and urine were evaluated by zymography. PEDF expression in the kidney was evaluated by western blot analysis and immunohistochemistry.

Results: Plasma level of glucose, HbA1c were increased by about 2-3-folds in diabetic rats, compared with non-diabetic control rats (plasma glucose; 589 ± 38 mg/dl, HbA1c; 8.8 ± 0.3 % in diabetic rats). Zymography revealed that active MMP-2 expression in the glomeruli and urine were increased to about 4-5-folds in diabetic rats, which were associated with the elevation in urinary albumin excretion. PEDF expression in the glomeruli was down-regulated in experimental diabetes. Further, when proteins extracted from glomeruli of control rats were exposed to MMP-2, PEDF levels were found to be decreased in an MMP-2-dose-dependent manner.

Conclusions: The present study demonstrated for the first time that MMP-2 overexpression at early phase of diabetic nephropathy was involved in PEDF down-regulation in the diabetic kidney. Our observations suggest that restoration of PEDF via MMP-2 suppression may offer a promising strategy for halting the development and progression of diabetic nephropathy.

THE PLASMA GLUCOSE LOWERING ACTION OF NTU-SLR-C IN NORMAL AND DIABETIC MICE

C.T. Ruan¹, S.H. Lam², Y.C. Weng¹, T.C. Chi³, S.S. Lee², M.J. Su¹

¹National Taiwan University, Department of Pharmacology, Taipei City, Taiwan, Republic of China, ²National Taiwan University, School of Pharmacy, Taipei City, Taiwan, Republic of China, ³Chang Jung Christian University, Graduate Institute of Medical Sciences, Tainan, Taiwan, Republic of China

Aims: In this study, the antihyperglycemic principle of NTU-SLR-C isolated from a herbal plant was examined and compared with other antidiabetic agents in mice.

Methods: 8 to 10-week-old male ICR, streptozotocin (STZ)-induced diabetic (IDDM) and diet-induced obese (NIDDM) mice were enrolled in the study. Mice were treated with single intraperitoneal (i.p.) injection of NTU-SLR-C (5mg/kg) or other active agents. Biochemical parameters such as blood glucose and plasma insulin were measured using the glucose oxidase method and insulin ELISA. The protein level of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) was determined using Western blotting analysis.

Results: After 60-min injection, NTU-SLR-C decreased the plasma glucose concentrations in a dose-dependent manner from 0.1 to 5 mg/kg. The hypoglycemic actions of NTU-SLR-C in normal and NIDDM mice were associated with an increase of plasma insulin level; however, the insulin levels remained unchanged in IDDM mice. NTU-SLR-C attenuated the elevation of plasma glucose induced by an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and increased glycogen synthesis. Moreover, elevated protein levels of PEPCK in liver from STZ-diabetic mice were reversed after treatment with NTU-SLR-C two times daily for seven days.

Conclusion: Our study proved that the mechanisms contributing to the hypoglycemic effect of NTU-SLR-C include insulin-dependent and insulin-independent pathway. Both the increase in the glucose utilization in peripheral tissue and the reduction in hepatic gluconeogenesis contribute to the lowering of plasma glucose. Thus, this compound may become a useful agent for the treatment of diabetic disorders.

INTERACTION BETWEEN LEPTIN AND INSULIN IN SKELETAL MUSCLE DURING AGEING IN WISTAR RAT

A.J. De Solis, J.M. Carrascosa

Centro Biología Molecular Severo Ochoa CBMSO (UAM-CISC), Dpto. Biología Molecular. Univ. Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Wistar rats develop adiposity, hiperleptinemia and whole body insulin resistance during ageing. Here we study how hiperleptinemia influences directly insulin action in skeletal muscle (SM) during ageing and the effect of moderate caloric restriction (CR). We determined the insulin effect (100 nM, 20 min) on 2-deoxyglucose uptake in type I (soleus) and type IIa (EDL) isolated muscles pre-incubated with leptin (5 nM, 20 min). Studies were carried out on 3-, 8- and 24-month old rats fed ad libitum, and in 8- and 24-months old animals after three months of CR.

Our results show that insulin-induced activation of 2-DOG uptake decreases with ageing in SM, mainly in soleus. The CR increases the insulin effect in 8-month, but not in 24-month old rats. Leptin also stimulates the 2-DOG uptake but to a lesser extent than insulin. This effect decreases with ageing in soleus and is restored by CR in both 8- and 24-month old rats.

Pre-treatment with leptin decreases the insulin stimulation of 2-DOG uptake only in leptin sensitive soleus from 3-month old animals and 8-month old rats after CR, but not in soleus from leptin resistant aged animals.

These data indicate that leptin exerts direct effects on SM and these effects might impair insulin action in contrast to its insulin-sensitizing effects on SM elicited through the CNS. Development of hyperleptinemia during ageing leads to central leptin resistance. Thus, it is tempted to propose that leptin, acting directly on SM, could contribute to the insulin resistance of this tissue in old animals.

